



ISA AZEVEDO DE ALMEIDA
Cirurgiã-Dentista

***PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA
IDENTIFICAÇÃO DO NANOPLEX Y-STR
EM AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO***

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia Legal e Deontologia.

UNICAMP
PIRACICABA
-2003-

ISA AZEVEDO DE ALMEIDA
Cirurgiã-Dentista

**PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA PARA
IDENTIFICAÇÃO DO NANOPLEX Y-STR EM
AMOSTRAS DE SANGUE HUMANO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Odontologia Legal e Deontologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Isabela Almeida Pordeus

Prof. Dr. Eduardo Daruge

Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior

Suplente: Prof^ª. Dr^ª. Gláucia M. Bovi Ambrosano

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CCPG-03/03/03
Assinatura do Orientador

PIRACICABA
-2003-

UNIDADE	Be
Nº CHAMADA	TTUNICAMP
	AL64p
V	EX
TOMBO BC/	54276
PROC.	124/08
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	
Nº CPD	

CM0018521B-1

BIB ID 293089

Ficha Catalográfica

AL64p Almeida, Isa Azevedo de.
 Padronização da técnica para identificação do Nanoplex em amostras de sangue humano. / Isa Azevedo de Almeida. Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.
 xxvi, 115p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Cromossomo Y. 2. Multiplex. 3. DNA. I. Daruge Júnior, Eduardo. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2003, considerou a candidata ISA AZEVEDO DE ALMEIDA aprovada.

1. Prof. Dr. EDUARDO DARUGE JUNIOR

2. Profa. Dra. ISABELA ALMEIDA PORDEUS

3. Prof. Dr. EDUARDO DARUGE

200320603

NUNCA ESMOREÇAS

Alma fraterna recorda:
os momentos infelizes
parecem noites de crises
Em que o céu lembra um vulcão;
Ribombam trovões no espaço,
Coriscos falam da morte,
Passa irado o vento forte,
Tombando troncos no chão...
Os animais pequeninos
Gritam pedindo socorro
Descendo de morro em morro,
Cai a enxurrada a correr...
Mas finda a borrasca enorme,
No escuro da madrugada,
Em riscas de luz dourada,
Vem o novo amanhecer.
Assim também na vida,
Se atravessas grandes provas,
Na estrada em que te renovas,
Guada a calma ativa e sã;
Sofre, mas serve e caminha,
Vence a sombra que te invade,
Se a hora é de tempestade,
Há um novo dia amanhã...

(Emmanuel - Psicografia de Francisco Xavier, 25/09/91)

**"TUDO É OUSADO PARA QUEM NADA SE ATREVE."
FERNANDO PESSÔA**

Dedico este trabalho

Aos meus pais *Lucy e Fernando*, por sempre me apoiarem em todas as decisões e estando sempre ao meu lado em todos os momentos, muitas vezes se sacrificando para que eu pudesse chegar até aqui, dando amor, carinho, paz e segurança.

Ao meu irmão *Fernando*, o grande amor da minha vida! Quem me fez sorrir e chorar, porém acredito que tem me dado inúmeros motivos para sorrir e ser feliz.

Ao *Alfredo* por me dar apoio, carinho e me fazer enxergar nos momentos confusos da vida.

Ao *Carlos*, meu marido, que acompanhou as dificuldades para a realização do trabalho sempre me encorajando, apoiando e incentivando. Nas vitórias e dificuldades sempre sendo cúmplice. Mais que meu Marido, é um Amigo, um Cúmplice, um Sonho, meu AMOR!

A minha saudosa tia *Yara* que foi um exemplo de mulher vitoriosa e que certamente está vibrando por mim.

À minha grande amiga *Cristhiane* por estar sempre ao meu lado, em todos as conquistas e dificuldades da vida, sendo uma verdadeira companheira de jornada, uma Irmã!

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e acreditaram em mim!

Agradecimentos Especiais

A *Deus*, pois por ser sua filha, tenho conseguido ter uma vida de Paz,
Carinho, Amor, Sorrisos e Conquistas. Muito Obrigada!

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual
de Campinas- UNICAMP.

Ao Prof. Dr. *Eduardo Daruge* por ter me acolhido como filha e
acreditado em mim. Sendo conselheiro e amigo. Sendo enérgico, porém, também,
compreensivo nos momentos certos. Muito obrigada pelo voto de confiança dado
a mim!

Ao Prof. Dr. *Eduardo Daruge Júnior*, pois além de ser orientador
deste trabalho, auxiliou-me nos momentos difíceis de sua realização.

Ao Prof. Dr. *Roberto José Gonçalves* por ter acreditado em minha capacidade e por sua justiça nos momentos decisivos para meu ingresso neste curso.

À Prof^a. Dr^a. *Gláucia Maria Bovi Ambrosano*, pelo auxílio nos momentos de dúvidas, sendo atenciosa e compreensiva. Uma mulher admirável!

Ao Prof. Dr. *João Bosco Penna*, pelo seu apoio e incentivo e pelas oportunidades de vida que me proporcionou. Um grande Amigo!

Ao Prof. Dr. *Fernando Ferreira Costa*, pelo seu apoio e pela oportunidade de executar este trabalho.

Aos Professores Doutores *Duarte Nuno Vieira e Francisco Corte-Real*, pelo apoio, exemplo de conquistas e conduta.

Às queridas Dr^a *Maria Conceição Vide* e *Márcia Valéria Fernandes Diederiche Lima dos Santos*, pela paciência no curto tempo de convivência, dando exemplos de mulheres batalhadoras e vencedoras.

Às funcionárias do Instituto Nacional de Medicina Legal-Delegação Coimbra, Serviço de Genética e Biologia Forense, pela acolhida e apoio dados a mim.

À *Dona Marlene Rasera*, por ter me acolhido com tanto carinho, acompanhando os momentos importantes desta etapa da minha vida. Muito Obrigada!

Às minhas amigas da pensão, *Rosana, Daniela, Sabrina, Belkys*, pelos momentos de companheirismo e amizade.

Aos meus amigos do curso de pós-graduação: *Célio, Hélison, Luís Renato, Galvão, Sérgio, Tânia, Simone, Andréa, Ana Paola, Belkys*, que

puderam compartilhar momentos de amizade, carinho, atenção e dificuldades. Muito Obrigada!

A todos os colegas do curso de pós-graduação pela troca de conhecimentos, carinho e descontração. Muito obrigada por participarem desta etapa tão importante da minha vida!

Aos funcionários da FOP-UNICAMP, *Celinha, Dinoly, Cidinha, Lu, Érica, Sônia, João Leite*, pelo carinho e por terem atendido tão prontamente e participado desta etapa da minha vida.

Aos funcionários do Laboratório Genoma UNICAMP, *Dulcinéia, Ângela, Heloísa, Ucha e Anderson* por terem me acolhido com compreensão, carinho e companheirismo para a realização desta pesquisa.

Às bibliotecárias *Marilene Girello e Heloísa Maria Ceccoti*, pela atenção em corrigir e paciência em orientar na formatação deste trabalho.

À Instituição *CAPES* pela concessão da bolsa de estudo.

À *Secretaria de Segurança Pública do Estado de Mato Grosso*,
Instituto Médico Legal de Mato Grosso, por ter contribuído com meu
crescimento profissional.

A *todos* que de alguma maneira contribuíram para realização deste
trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	01
Lista de Tabelas.....	03
Lista de Anexos.....	05
Lista de Abreviaturas.....	07
Resumo.....	09
Abstract.....	11
1- Introdução.....	13
2- Revisão da Literatura.....	21
2.1.1. Bioquímica do DNA.....	21
2.1.2. Cromossomo Y.....	24
2.1.3. Microssatélites do Cromossomo Y ou STRs.....	27
2.1.4. Polimorfismo do Cromossomo Y.....	30
2.2. Casos Forenses.....	32
2.3. Genética Populacional e utilização de Multiplex.....	38
3- Proposição.....	53
4- Material e Métodos.....	55
4.1. Casuística.....	55
4.2. Materiais e Equipamentos.....	55
4.3. Métodos.....	56
4.3.1. Extração do DNA.....	56
4.3.2. Quantificação do DNA Extraído.....	57
4.3.3. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	58
4.3.4. Eletroforese.....	61

4.3.5. Designação Alélica.....	61
5- Resultados.....	63
5.1. Armazenamento do DNA.....	63
5.2. Extração do DNA.....	63
5.3. PCR Nanoplex.....	64
5.4. Designação Alélica.....	70
5.5.1. Sistema DYS 19.....	70
5.5.2. Sistema DYS389 I.....	71
5.5.3. Sistema DYS389 II.....	72
5.5.4. Sistema DYS390.....	73
5.5.5. Sistema DYS391.....	74
5.5.6. Sistema DYS392.....	75
5.5.7. Sistema DYS393.....	76
5.5.8. Sistema DYS385 I.....	77
5.5.9. Sistema DYS385 II.....	78
6- Discussão.....	79
6.1. Armazenamento das Amostras em FTA® Blood Cards	80
6.2. Extração por CHELEX100®.....	81
6.3. PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	83
7- Conclusões.....	89
Referências Bibliográficas.....	91
Anexo.....	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Composição da cadeia de DNA com as diferentes bases nitrogenadas.....	22
Figura 2: Cromossomo Y.....	25
Figura 3: Microssatélites do cromossomo Y	29
Figura 4: Cromatograma Amostra 553/01.....	65
Figura 5: Cromatograma Amostra 556/01.....	65
Figura 6: Cromatograma Amostra 558/01.....	65
Figura 7: Cromatograma Amostra 562/01.....	65
Figura 8: Cromatograma Amostra 568/01.....	65
Figura 9: Cromatograma Amostra 573/01.....	66
Figura 10: Cromatograma Amostra 728/01.....	66
Figura 11: Cromatograma Amostra 729/01.....	66
Figura 12: Cromatograma Amostra 733/01.....	66
Figura 13: Cromatograma Amostra 767/01.....	66
Figura 14: Cromatograma Amostra 771/01.....	67
Figura 15: Cromatograma Amostra 772/01.....	67
Figura 16: Cromatograma Amostra 774/01.....	67
Figura 17: Cromatograma Amostra 785/01.....	67
Figura 18: Cromatograma Amostra 803/01.....	67
Figura 19: Cromatograma Amostra 804/01.....	68
Figura 20: Cromatograma Amostra 805/01.....	68
Figura 21: Cromatograma Amostra 827/01.....	68
Figura 22: Cromatograma Amostra 849/01.....	68
Figura 23: Cromatograma Amostra 85401.....	68
Figura 24: Cromatograma Amostra 874/01.....	69
Figura 25: Cromatograma Amostra 876/01.....	69
Figura 26: Cromatograma Amostra 893/01.....	69
Figura 27: Cromatograma Amostra 894/01.....	69
Figura 28: Cromatograma Amostra 913/01.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características dos Primers utilizados.....	59
Tabela 02- Resultado da Quantificação do DNA.....	64
Tabela 03- Designação Alélica observada no sistema DYS19.....	70
Tabela 04- Designação Alélica observada no sistema DYS389 I.....	71
Tabela 05- Designação Alélica observada no sistema DYS389 II.....	72
Tabela 06- Designação Alélica observada no sistema DYS390.....	73
Tabela 07- Designação Alélica observada no sistema DYS391.....	74
Tabela 08- Designação Alélica observada no sistema DYS392.....	75
Tabela 09- Designação Alélica observada no sistema DYS393.....	76
Tabela 10- Designação Alélica observada no sistema DYS385 I.....	77
Tabela 11- Designação Alélica observada no sistema DYS385 II.....	78
Tabela 12- Características particulares de cada marcador do cromossomo Y estudado.....	85

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Certificado do Comitê de Ética e Pesquisa	104
ANEXO B: Autorização para Coleta de Amostras do IML-MT.....	105
ANEXO C: Tabela com os Indivíduos Estudados.....	106
ANEXO D: Página Inicial do Site da ISFG.....	107
ANEXO E: Página Inicial do Site da GDB.....	108
ANEXO F: Informações GDB locus DYS393.....	109
ANEXO G: Informações GDB locus DYS392.....	110
ANEXO H: Informações GDB locus DYS391.....	111
ANEXO I: Informações GDB locus DYS390.....	112
ANEXO J: Informações GDB locus DYS389.....	113
ANEXO L: Informações GDB locus DYS19.....	114
ANEXO M: Página Inicial do Site Y STR Database.....	115
ANEXO N: Página Inicial do Site GEP-ISFH.....	116

LISTA DE ABREVIações

A	Adenina
ABO	Sistema Sangüíneo ABO
BSA	(bovine serum albumin) – Albumina bovina sérica
C	Citosina
dH₂O	água pura desionizada
dNTP	Deoxinucleotídeo trifosfato
DNA	(desoxiribonucleic acid) – Ácido desoxirribonucléico
EDTA	(etilenodiaminotetracetic acid)– Ácido etilenodiaminotetracético
FBI	(Federal Bureau of Investigation) – Agencia Federal de Investigação dos Estados Unidos da América
GC	proteína sérica sangüínea GC
G	Guanina
HLA	antígenos eritrocitários humano
ISFH	(International Society of Forensic Hematology) – Sociedade Internacional de Hematologia Forense
MN	Grupo Sangüíneo MN
mtDNA	DNA mitocondrial
P	antígeno eritrocitário P
pb	pares de bases
PCR	(polymerase chain reaction) – Reação em cadeia da polimerase
Rh	Fator Sangüíneo Rh
STR	(short tandem repeats) – pequenas repetições repetidas uma após a outra
T	Timina

Taq polimerase	enzima polimerase originada da alga <i>Thermus aquaticus</i>
VNTR	(<i>variable number of tandem repeats</i>) – número variável de repetições seguidas uma após a outra
Y-STRs	pequenas repetições seguidas uma após a outra do cromossomo Y
μl	unidade de medida que representa microlitro.

RESUMO

Nas últimas décadas, as Ciências Forenses vêm evoluindo de maneira a esclarecer e auxiliar cada vez mais precisamente a justiça. O presente trabalho, através da utilização de 25 amostras de sangue de cadáveres do Instituto Médico Legal de Cuiabá-MT, teve como objetivos: estabelecer a forma de coleta do material biológico através da utilização de cartões FTA®; aprimorar a extração do DNA em amostras de sangue, utilizando a Resina Quelante CHELEX®; aprimorar a PCR utilizando os *primers* para os *loci* DYS 385 I/II, DYS 389 I/II, DYS 390, DYS 391, DYS 392, DYS 393, DYS 19 através da padronização do Nanoplex; comprovar a importância do estudo do cromossomo Y nos casos de investigação de paternidade e em casos forenses. Com o desenvolvimento do trabalho, pôde-se observar que os métodos de coleta das amostras de sangue e extração do DNA foram satisfatórios, pois obteve-se uma quantidade de DNA suficiente para o seu estudo. O estudo do Nanoplex fez-se com sucesso, pois, por meio de sua análise em um seqüenciador automático (ABI PRISM DNA Sequencer 377), pôde-se detectar os fragmentos, estipulando-se, assim, seus respectivos alelos.

ABSTRACT

In the last decades, the Forensic Sciences come evolving in way to clarify and to assist the justice. The present work through the use of 25 samples of corpse blood of the Legal Medical Institute of Cuiabá-MT had as objective: to establish the form of collection of the biological material through the use of cards FTA®; to improve the extraction of the DNA in samples of blood being used the Resin Quelante CHELEX®; to improve the PCR using primers for locus DYS 385 I/II, DYS 389 I/II, DYS 390, DYS 391, DYS 392, DYS 393, DYS 19 through the standardization of the Nanoplex; to prove the importance of Y chromosome study in the cases of paternity and in forensic cases. With the development of the work it could be observed that the methods of collection of blood samples and extration of the DNA had been satisfactory, therefore got a enough amount of DNA for its study. The study of the Nanoplex one became successfully, therefore through its analysis in an automatic sequencer (ABI PRISM DNA Sequencer 377), it could be detected the fragments, stipulating its respective alleles.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as Ciências Forenses vêm esclarecendo e auxiliando cada vez mais precisamente a justiça, devido a sua evolução, aperfeiçoamento dos testes de identificação e graças ao desenvolvimento dos métodos de Biologia Molecular.

Os casos forenses que antes eram considerados inconclusivos, hoje já podem ser esclarecidos, com a utilização de técnicas moleculares para avaliar características genéticas (estudo do DNA). Estas vêm se adicionando aos testes tradicionais, contribuindo significativamente devido ao seu maior poder discriminativo. Dentro desta evolução, podemos citar os marcadores genético-moleculares dentre eles: antígenos eritrocitários (sistema AB0, Rh, MNs, Kell, Fy, Lutheran, P), proteínas séricas (alfa₁-antitripsina, transferrina, GC, haptoglobina), enzimas eritrocitárias ou leucocitárias (fosfatase ácida, adenosinadesaminase, fosfoglucomutase, esterase D, glioxalase), antígenos com maior histocompatibilidade (região HLA) e o polimorfismos do DNA. (CORTE-REAL, 1999)

Desde Alexandre Lacassagne, em 1889, na identificação de um cadáver putrefeito em Lion - França, passando por Amoedo, em 1897, no Bazar da Caridade e, em 1903, com a identificação de corpos carbonizados na Ópera Cômica de Paris, ressaltando a importância da análise dos aspectos odontológicos

através de seu Sistema Odontológico de Identificação (FRANÇA, 1998), com a descoberta do ácido desoxirribonucleico (DNA) por WATSON e CRICK, em 1953, e com o desenvolvimento da PCR (Polymerase Chain Reaction), em 1987, por Müllis (FARAH, 1997), iniciou-se uma revolução na ciência, pois através da PCR, era possível amplificar o DNA de uma única célula. Sendo assim, cada vez mais dados particulares vêm sendo obtidos, tornando-se inquestionáveis as identificações.

No campo do diagnóstico molecular, a análise de casos forenses é uma das investigações que mais têm exigido empenho, devido ao seu impacto social.

Um importante fator que nos possibilita o estudo no decorrer da vida de um indivíduo, ou amostras forenses, é que os polimorfismos do DNA são caracteres unitários, estando presentes desde antes do nascimento (havendo, por isso, a possibilidade de estudos pré-natais) até a velhice por não sofrerem alterações por fatores externos, sendo imutáveis durante toda a vida, podendo ser pesquisados em numerosas áreas (estudos populacionais, estudos de genética clínica ou em genética forense - casos de investigações de filiação, de criminalística biológica e de identificação) (CORTE-REAL, 1999).

A primeira vez que o Polimorfismo do DNA foi estudado em Medicina Legal foi na Inglaterra, em abril de 1985, onde se resolveu um caso de imigração

através do DNA Fingerprinting (JEFFREYS *et al.*, 1985) e em casos penais, também na Inglaterra em outubro de 1986, no caso Enderby, onde o principal suspeito de um crime foi absolvido graças ao exame de DNA (GILL & WERRET, 1987).

Desde 1996, em Berlim, no Primeiro *Y-User Workshop*, dados de todo o mundo vêm sendo coletados e protocolos vêm sendo aprimorados, bem como, freqüências alélicas vêm sendo anunciadas (NATA *et al.*, 1999). Todos os esforços têm como objetivo auxiliar a justiça.

Para o estudo genético de freqüência alélica, alguns detalhes devem ser considerados: para que se possa efetuar o uso de determinados marcadores é fundamental o conhecimento da freqüência haplotípica (NATA *et al.*, 1999). Os dados populacionais têm que estar determinados na população onde se aplicam e as freqüências gênicas a serem utilizadas devem ter sido publicadas (CARRACEDO *et al.*, 1996).

Entre todos os cromossomos, o Y vem sendo cada vez mais estudado devido ao seu interesse nos casos forenses e em genética populacional.

A principal vantagem dos Y-STRs é a capacidade de detectar o componente masculino em uma mistura de DNA masculino ou feminino. É também comumente usado para determinar o número de sêmen do doador em

uma mistura de dois ou mais homens (PRINZ *et al.*, 2001), sendo de grande valia na identificação de agressores (GATTAS, 1990), podendo também ser usado nos casos onde existe mais de um suspeito envolvido (KUPIEC *et al.*, 2000).

O estudo do cromossomo Y pode ser utilizado em teste de paternidade, investigações evolutivas e antropológicas e em identificação humana, porém, sua aplicação na rotina forense necessita do estabelecimento de parâmetros populacionais prévios que embasem a determinação das variações alélicas dos diferentes loci para determinada população, dados estes fundamentais para sua utilização na atividade pericial (OLIVEIRA, 2000).

Atualmente no Brasil, vem crescendo o número de pesquisadores que têm estudado as características genéticas da população (OZAKI, 1999; JOBIM 1999; BARROS DE CASTRO *et al.*, 2000; CASTRO, 2000; COSTA, 2002) e analisado a importância deste estudo nos casos forenses (ALVES, 2000; OLIVEIRA, 2001; MIYAJIMA, 2001; MOCELIN, 2001; KALUPNIEK, 2002). Sendo que dentre eles estão médicos, odontólogos, biólogos, biomédicos e bioquímicos.

Infelizmente alguns Pesquisadores se esquecem de que a ciência é dinâmica e se acham no direito de privar algumas classes profissionais de auxiliar a Justiça ao se tratar do estudo da Genética Forense. Cabe a nós, Profissionais da Saúde, esclarecer que estamos amparados pela Lei e dentro das atribuições de nossa profissão. Sendo assim, devemos citar o Processo Consulta

nº4.720/2000-CFM (29/01), referente ao Projeto de Lei nº 2.642/00 sobre as condições de realização e análise de exames genéticos em seres humanos, onde foi decretado pelo Congresso Nacional:

“... Art. 3º - A assinatura dos laudos, atestados e resultados de exames provenientes da análise de material genético humano deve ser feita por profissionais graduados em qualquer das Ciências da Vida e que possuem pós-graduação ou mestrado em Genética ou Biologia Molecular...” (grifo nosso).

Segundo a Consolidação Das Normas Para Procedimentos Nos Conselhos De Odontologia (Aprovada pela Resolução CFO-209/97), TÍTULO I – DO EXERCÍCIO LEGAL; SEÇÃO IV - Odontologia Legal define:

“Art. 54. Odontologia Legal é a especialidade que tem como objetivo a pesquisa de fenômenos psíquicos, físicos, químicos e biológicos que podem atingir ou ter atingido o homem, vivo, morto ou ossada, e mesmo fragmentos ou vestígios, resultando lesões parciais ou totais reversíveis ou irreversíveis.

Parágrafo único. A atuação da Odontologia Legal restringe-se a análise, perícia e avaliação de eventos relacionados com a área de competência do cirurgião-dentista podendo, se as circunstâncias o exigirem, estender-se a outras áreas, se disso depender a busca da verdade, no estrito interesse

da justiça e da administração...” (grifo nosso)

No Artigo 55 que define as áreas de competência para atuação do especialista em Odontologia Legal, incluem:

“...a) identificação humana;

b) perícia em foro civil, criminal e trabalhista...

...i) perícia logística no vivo, no morto, íntegro ou em suas partes em fragmentos;

j) perícia em vestígios correlatos, inclusive de manchas ou líquidos oriundos da cavidade bucal ou nela presentes;”(grifo nosso)

Logo, estamos amparados por Lei a executar exames de DNA em investigações forenses e em exames de paternidade, já que, de acordo com as atribuições dos cirurgiões-dentistas, podemos desempenhar perícias para auxiliar a justiça.

Cabe aos interessados procurar cada vez mais sua capacitação para então exercer as preteridas atividades legalmente.

Sendo assim, no intuito de auxiliar cada vez mais a Justiça, efetuamos um estudo da padronização do nanoplex dos *loci* do cromossomo Y e

ressaltamos, através de um levantamento bibliográfico de casuísticas forenses, a importância do estudo do seu polimorfismo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 BIOQUÍMICA DO DNA

O DNA é considerado como uma cópia genética original e única de um indivíduo. Este pode ser encontrado em cada uma das células nucleadas do corpo de uma pessoa e permanece constante ao longo da vida. A molécula de DNA é um polímero composto por quatro unidades ou blocos básicos chamados nucleotídeos. Cada nucleotídeo contém uma pentose como açúcar -desoxirribose- (este fator permite a distinção entre os dois tipos de ácidos nucléicos, sendo que o DNA possui como açúcar a 2-desoxirribose e o RNA possui a ribose (OZAKI, 1999), um fosfato (PO_4^-) e uma base nitrogenada (Fig.1¹). O DNA possui quatro nucleotídeos diferentes, e esses se diferem uns dos outros somente na base nitrogenada que possuem. Essas bases são as purinas -Adenina e Guanina- e pirimidinas -Citosina e Timina (BUDOWLE, 2000) (Fig. 1).

Uma cadeia simples de DNA é composta por uma sequência de nucleotídeos unidos covalentemente através de união fósforo-diéster entre o carbono da extremidade 5' da desoxirribose e um nucleotídeo e o carbono de extremo 3' da desoxirribose do nucleotídeo adjacente (BUDOWLE, 2000). A sequência, ou seja, a ordem das diferentes bases (A, C, T, G) pode variar em sua

ordem ao longo da cadeia polinucleotídica. Uma grande variedade de formações pode aparecer em uma sequência relativamente curta de DNA alternando-se os quatro nucleotídeos.

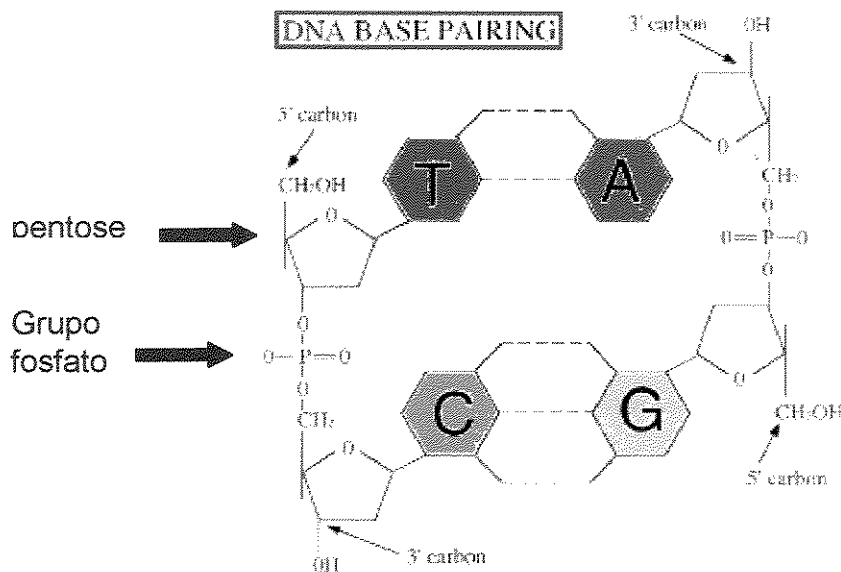


Figura 1 Composição da cadeia de DNA com as diferentes bases nitrogenadas

FONTE: <http://www.biology.washington.edu/fingerprint/dnaintro.html>

No genoma humano, existe 3 milhões de nucleotídeos, divididos em 23 cromossomos diferentes por indivíduo, sendo que nos indivíduos do sexo masculino existe um cromossomo X e um cromossomo Y (tecnicamente seriam 24 cromossomos diferentes). Considerando a capacidade de combinação em

diferente ordem nucleotídica, existem mais possíveis formações do que a quantidade de indivíduos existentes no planeta (BUDOWLE, 2000).

A molécula de DNA é composta de duas cadeias de polinucleotídeos que formam uma molécula helicoidal. As duas cadeias polinucleotídicas são representadas na orientação 5'→ 3'. São pareadas, dispostas em direção contrária, por isso são denominadas antiparalelas (OZAKI, 1999). As duas cadeias associam-se com pontes de hidrogênio entre as bases complementares de cada cadeia. Quando existir uma Adenina em uma cadeia, ela somente formará pontes de hidrogênio com uma Timina de outra cadeia; sendo assim, com a Guanina e Citosina. São chamadas de bases complementares. Uma pirimidina simples que está unida por pontes de hidrogênio a sua purina complementar em uma cadeia oposta é o que se conhece como “um par de bases”. Devido à especificidade de pareamento entre as bases nitrogenadas, a seqüência de uma cadeia é sempre complementar à outra, isso graças a Lei de Chargaff que, em 1951, descreveu a propriedade físico-química dos ácidos nucléicos, e que define a especificidade da interação entre as bases nitrogenadas purínicas e pirimidínicas, onde a guanina pareia-se somente com a citosina, por uma ligação de três pontes de hidrogênio e a adenina pareia-se somente com a timina através de duas pontes de hidrogênio (OZAKI, 1999).(Fig. 1)

Logo, pode-se dizer que quando a sequência de uma cadeia polinucleotídica é conhecida, a ordem da cadeia complementar pode ser deduzida

De acordo com FOWLER *et al.*, (1988), existem algumas variedades de DNA: DNA codificante (45%), DNA não codificante (55%):- não repetitivo (25%), repetitivo (20 a 30%):- disperso (≈ 15 a 20%):- SINES ("*short interspersed elements*") com <500pb, LINES ("*long interspersed elements*") com >500pb; em tandem ($\approx 10\%$): - satélites clássicos,- minissatélites,- microsatélites.

2.1.2 CROMOSSOMO Y

O cromossomo Y vem sendo cada vez mais estudado devido ao seu interesse nos casos forenses e em genética populacional por possuir microsatélites e outros polimorfismos (ROEWER *et al.*, 1992)

É um elemento acrocêntrico pequeno que somente representa 2% do complemento cromossômico. Contém por volta de $6 \cdot 10^7$ pb. 2% do DNA é constituído por seqüências polimórficas, altamente repetidas e está localizado

principalmente na porção heterocromática do braço longo, desde Yq13 até Yqter.

(Fig.2)

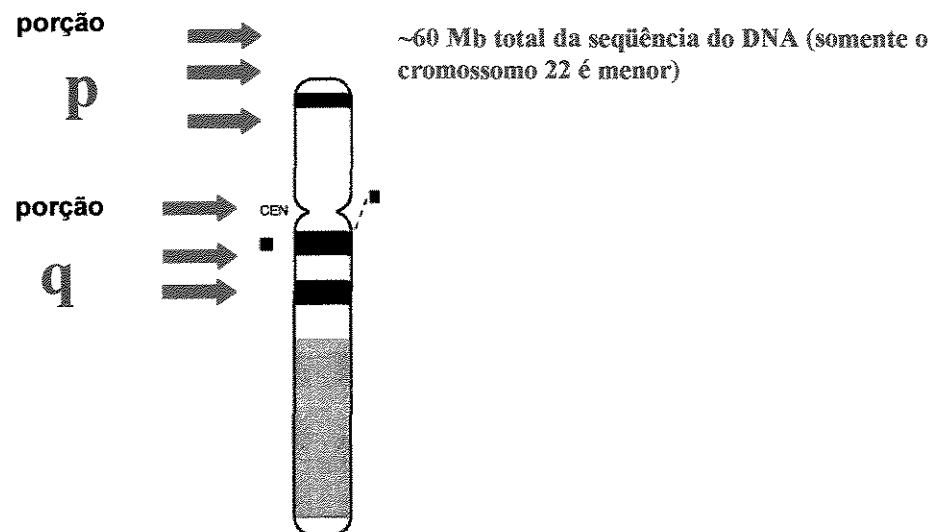


Figura 2 Cromossomo Y

FONTE: *Nucleic Acids Res.* 28(2), e8 (2000)

Em 1978 CASPERSSON *et al.*, descreveram uma estrutura que possuía grande afinidade por substâncias fluorocrômicas e que estava presente em núcleos interfásicos de células de indivíduos normais do sexo masculino e ausente em células de indivíduos do sexo feminino. Caracterizaram assim a cromatina Y (GATTAS *et al.*, 1990).

A sua cromatina Y representa a porção distal do cromossomo Y presente nos núcleos interfásicos de indivíduos normais do sexo masculino, constituindo-se como um método de extrema importância para determinação do sexo em líquidos orgânicos, na prática forense (GATTÁS *et al.*, 1990).

A maior parte do cromossomo Y humano consiste em seqüências hipervariáveis (COOKE, 1976), que podem ser utilizadas para a caracterização do cromossomo Y em humanos. As ligações dos *loci* Y são interessantes, pois são haplótipos e paternalmente herdados. Esta propriedade faz com que o estudo dos STRs do cromossomo Y seja muito importante. (DEKA *et al.*, 1996; KNIFF *et al.*, 1997; PEREZ-LEZAUN *et al.*, 1997), podendo ser utilizado para a caracterização do cromossomo Y humano individualmente (REICHENPFADER *et al.*, 2000).

Diferentes variações dos *loci* Y-STR deveriam ser combinadas haploticamente, porque o cromossomo Y não é recombinante (Nata *et al.*, 1999). Possui uma grande utilidade na área forense, devido a presença de microsatélites e outros polimorfismos (ROEWER *et al.*, 1992).

O cromossomo Y, por não possuir um cromossomo homólogo, não se recombina durante a meiose, sendo assim, somente serão identificados alelos de

origem masculina, herdados em bloco dos antepassados masculinos (JOBIM *et al.*, 1999).

2.1.3 MICROSSATÉLITES DO CROMOSSOMO Y OU STRs

Os STRs são regiões altamente polimórficas compostas por uma sequência de 2-7 nucleotídeos (BRINKMANN, 1996) ou 1 a 6 nucleotídeos (KIMPTON *et al.*, 1993) que se repetem em *tandem* (uma após a outra), sendo precisamente, a variação do número de vezes que se repetem a unidade de sequência da base de seu polimorfismo genético. A grande vantagem de se trabalhar com os STRs é devido ao tamanho de seus alelos que são geralmente menores que 350pb sendo possível ser analisados através de técnica de amplificação genética (PCR). Já LEE *et al.*, (1994) os consideram com 500 pares de bases.

Os microssatélites são marcadores polimórficos de DNA que contém uma sequência repetida de nucleotídeos. Segundo EDWARDS *et al.*, (1992), os STRs podem ser utilizados na identificação humana, pois o número de repetições são diferentes, sendo possível haver alelos de diferentes comprimentos.

Os polimorfismos de STR são localizados em uma região não-recombinante do cromossomo Y e estão sendo aplicados em genética populacional, em estudos evolutivos e em casos forenses. O sistema de tipificação dos STRs de Y tem uma particular importância nos casos onde misturas de DNA masculino e feminino devem ser analisadas. Pode ser usado nos casos onde existe mais de um suspeito envolvido (KUPIEC *et al.*, 2000).

Os marcadores polimórficos do cromossomo Y têm sido extensivamente estudados na Medicina Forense para identificação de homens e nos testes de paternidade (PREVIDERÉ, 2000).

O estudo dos STRs do cromossomo Y oferece novas possibilidades de estudo genético populacional como, por exemplo, a investigação de imigrações masculinas, herança paterna e estimativa de divergência populacional (SCHULTES *et al.*, 1999).

Os STRs ou microsatélites são marcadores de DNA polimórficos comumente usados para obtenção de um perfil de DNA em análise forense e em

casos de testes de paternidade. Pelo fato da região não-pseudoautosômica do cromossomo Y se recombinar a combinação alélica de diferentes marcadores polimórficos, conhecidos como haplótipos, é passada de pai para filho sem alterações. Este fato permite que casos especiais em medicina legal sejam solucionados com fidelidade (RANGEL-VILLALOBOS, 2001) (Fig.3).

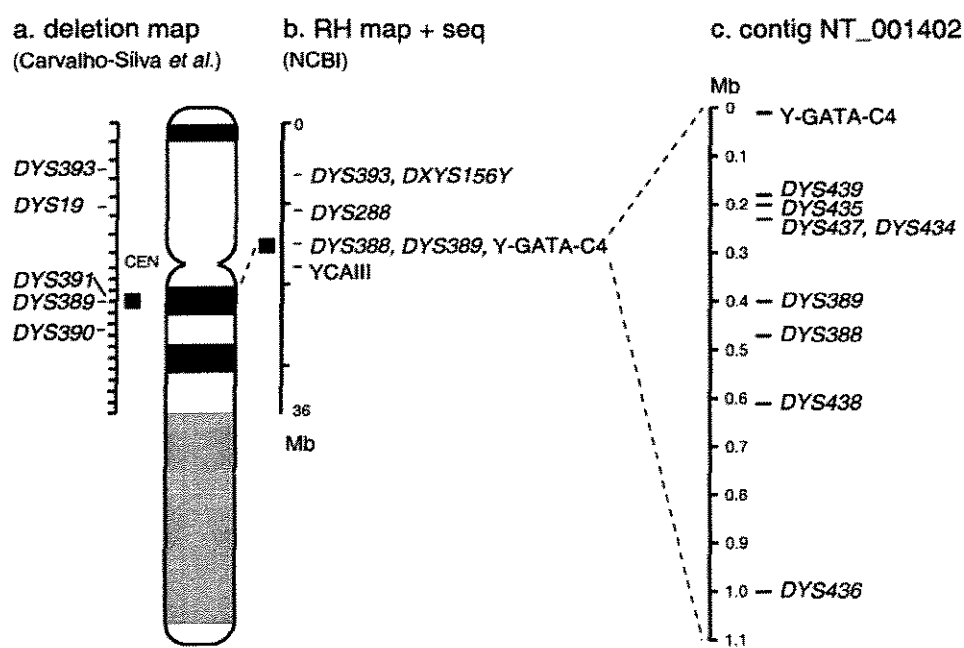


Figura 3 Microsatélites do cromossomo Y

FONTE: *Nucleic Acids Res.* 28(2), e8 (2000)

A principal vantagem dos Y-STRs é a capacidade de detectar o componente masculino em uma mistura de DNA masculino ou feminino. É também comumente usado para determinar o número de sêmen do doador em uma mistura de dois ou mais homens (PRINZ *et al.*, 2001).

Autores como KAYSER *et al.*, (2001) concluíram que o conhecimento sobre taxas de mutação e o processo que este ocorre nos casos de paternidade são cruciais para a interpretação correta de perfis genéticos resultantes.

Com a combinação dos *loci* dos alelos de inúmeros marcadores, é possível definir com alta precisão o haplótipo do cromossomo Y que admite a discriminação da maioria dos homens não-aparentados em uma amostra populacional (KAYSER *et al.*, 1997).

Os dados em STR dos cromossomos Y humanos fornecem um sistema modelo potencial para a compreensão das mutações dos STR autossômicos nos seres humanos e nas outras espécies. Uma das dificuldades de se efetuar a reconstrução evolutiva do STR é a ausência de uma metodologia apropriada (FORSTER *et al.*, 2000)

2.1.4 POLIMORFISMO DO CROMOSSOMO Y

Além de outros polimorfismos, o cromossomo Y é composto de microssatélites que possuem grande utilidade forense específica de acordo com sua forma de transmissão (ROEWER *et al.*, 1992).

Com o descobrimento da existência de regiões tetramétricas no cromossomo Y, com uma variabilidade compatível com a dos STRs autossômicos, pode-se dispor de maior número de marcadores para análise no campo da identificação humana, na genética populacional e nos estudos evolutivos (ROEWER *et al.*, 1992 e UNDERHILL *et al.*, 1996).

Possuindo uma herança exclusivamente paterna da região não recombinante do cromossomo Y, este pode ser utilizado para traçar a evolução de uma linhagem paterna (GOLDSTEIN *et al.*, 1996 e UNDERHILL *et al.*, 1996).

De acordo com a DNA Commission of the ISFH, existem dois tipos fundamentais de polimorfismos: - os polimorfismos provocados por mutações de um ou mais nucleotídeos (esta alteração pode originar fragmentos mais curtos ou mais compridos que os originais) e os polimorfismos produzidos por inserções ou deleções de um ou mais nucleotídeos ou unidades repetitivas, nomeadamente contendo um número variável de repetições em *tandem* de fragmentos de DNA - denominados VNTR "*variable number of tandem repeats*" (este polimorfismo se deve a diferenças no número de cópias da unidade repetitiva em cada um dos alelos, o que se traduz na existência de um grande número de tamanhos possíveis para um mesmo *locus*, permitindo a existência de múltiplos alelos e, portanto, de uma grande variabilidade genotípica) (CORTE-REAL, 1999).

Pode-se ressaltar com clareza a importância do estudo do polimorfismo do cromossomo Y para os casos forenses (KAYSER *et al.*, 1997 e PRINZ *et al.*, 1997).

2.2 CASOS FORENSES

GATTAS (1990) realizou estudos de evidências de agressões sexuais, principalmente aquelas com poucas quantidades de DNA e constatou que amostras degradadas ou com pouco espermatozóide eram beneficiadas, pois em misturas muito desproporcionais, onde existia grande quantidade de DNA feminino, não ocorria inibição da amplificação dos alelos ligados ao cromossomo Y, sendo esta a principal vantagem sobre os sistemas autossômicos e que a cromatina Y correspondia à porção distal do cromossomo Y presente nos núcleos interfásicos de indivíduos normais do sexo masculino, ressaltando, assim, a importância deste método à determinação do sexo em líquidos orgânicos na prática forense.

GATTÁS *et al.*, (1990) realizaram o estudo da cromatina Y onde efetuaram a exposição de crostas em temperatura ambiente. Em um primeiro experimento, as amostras ficaram expostas por 2 meses, e em um segundo

experimento (10 homens e 10 mulheres), durante 10 meses. Com a metodologia empregada, foi possível a determinação do sexo em crostas de sangue envelhecidas por um período de 6 meses.

PRINZ *et al.*, (1997) realizaram uma série de experimentos no intuito de comprovar a eficácia da análise de amostras mistas (homem/homem; homem/mulher) entre os sistemas Y-STR (DYS19, DYS390, DYS389 I/II) e o sistema autossômico VWF. Comprovaram que, para as amostras homem/homem, o limite de detecção de 1:10 e de 1:50, respectivamente, nos casos de misturas homem/mulher, os alelos Y-STR puderam identificar em baixas proporções como 1:2000, ou seja, 400pg de DNA masculino em 800 ng de DNA feminino.

ZEHNER *et al.*, (1998) estudaram a sensibilidade do DYS19 e da amelogenina para amplificar fragmentos de Y específicos, usando amostras de sangue artificial com quantidades variáveis de DNA masculino e feminino. O estudo confirmou a sensibilidade elevada de ambos os sistemas em detectar fragmentos masculino-específicos de PCR nas manchas que continham 10-25 moléculas do molde mesmo na presença de grande quantidade de DNA feminino na mistura pela detecção de coloração de prata. Relataram, porém, que amostras de sangue que continham 10% menos quantidade de células masculinas poderiam confiantemente ser identificadas somente quando ao menos 100 moléculas do

molde estivessem na amostra de sangue artificial, devido às quantidades crescentes de hemoglobina do sangue feminino que é um inibidor de PCR . Verificou-se que, ao serem analisadas as amostras de sangue com diferentes quantidades de sangue masculino e feminino, o sistema DYS19 possui grande sensibilidade ao amplificar os fragmentos Y-específicos.

SCHNEIDER *et al.*, (1999) realizaram um exercício conjunto entre 14 laboratórios participantes da EDNAP (grupo europeu que dita normas para estudo do DNA), usando DYS385 para detectar, registrar e identificar os resultados de cinco amostras de sangue desconhecidas e de uma amostra de controle. Coletaram também os dados da população de oito países europeus diferentes com tamanhos de amostras entre 91 e 150 indivíduos masculinos. Os resultados confirmaram observações precedentes de que o marcador DYS385 é um dos *loci* mais informativos entre os STRs ligados ao cromossomo Y. Observaram que os resultados produzidos foram independentes dos métodos de separação eletroforética e detecção usados. Com isso, verificaram que o DYS385 poderia servir como uma complementação útil ao sistema de estudo do STR autossômico rotineiramente usado em casos especiais.

CARVALHO *et al.*, (2000) efetuaram o estudo em diversos tecidos com diferentes estados de degradação dos haplótipos do DYS385 de 128 indivíduos do

sexo masculino não aparentados do centro de Portugal e puderam constatar a aplicabilidade em genética forense, nos casos de identificação de vestígios criminais e nomeadamente na identificação de suspeitos em vestígios de crimes sexuais.

SZIBOR *et al.*, (2000) constataram que o DYS19 era um dos marcadores mais úteis para aplicações genéticas, evolucionárias e forenses em uma população. Entretanto, os autores observaram que a amplificação do polimorfismo do DYS19, falha quando o DNA altamente degradado é usado. Projetaram, então, um novo par de *primers* que reduziu os tamanhos dos fragmentos de DYS19 comparados com os aqueles dos protocolos conhecidos. Utilizando estes *primers*, conseguiram uma melhor taxa de sucesso, particularmente quando as amostras putrefadas foram investigadas.

PRINZ *et al.*, (2001) trabalharam com inúmeras amostras de casos para ilustrar a aplicabilidade dos marcadores do cromossomo Y humano em casos forenses. Utilizaram os marcadores STRs DYS19,DYS389/I,DYS389/II e DYS390. Concluíram que a principal vantagem dos Y-STRs é a capacidade de detectar o componente masculino em uma mistura de DNA masculino ou feminino, sendo assim usado para determinar o número de sêmen do doador em uma mistura de dois ou mais homens.

KAYSER *et al.*, (2001) sugeriram a formação de uma base de dados de mutações quando analisaram 4999 transmissões genéticas de pai/filho de casos de paternidades confirmados (probabilidade $>$ ou $=$ 99,9%) em 15 *loci* de Y-STR que são aplicados geralmente nos casos forenses. Observaram que as características mutacionais observadas para Y-STRs trariam consequências importantes para as aplicações forenses, tais como a definição dos critérios para exclusões dos testes de paternidade e a interpretação de perfis genéticos na análise das manchas. Salientaram a importância da formação de uma base de dados de mutações, a fim de enriquecer as informações conhecidas sobre o cromossomo Y.

BETZ *et al.*, (2001) relataram um caso de violação que ocorreu em Stuttgart, Alemanha, onde, ao exame microscópico, não foi encontrado qualquer vestígio de espermatozóide no *swab* vaginal ou na calcinha. Extraíu-se, então, o DNA das células vaginal e epitelial e analisou-se pelo sistema SE33, TH01 e com o Profiler Plus®. Os resultados encontrados foram negativos para amostra misturada e não identificaram um perfil masculino. Porém, ao efetuarem a análise dos STRs através dos marcadores DYS391, DYS392, DYS393, DYS19 e DYS389/II, encontraram as mesmas características do suspeito. Utilizaram este haplótipo incompleto e procuraram na Base de Dados de Referência de Y-STR Haplotipos através da Internet Em uma amostra caucasiana da população de 3589

haplotipos mínimos, encontraram 71 emparelhamentos. O suspeito confessou o crime e foi condenado a 04 anos de prisão.

CORACH *et al.*, (2001) analisaram mais de 350 casos forenses com sucesso de diferentes áreas metropolitanas da Argentina por meio do emprego de um multiplex de cinco Y-STRs. Utilizaram um triplex (DYS19, DYS390 e DYS391) e um duplex (DYS392 e DYS393). Constataram que, no campo do diagnóstico molecular, a análise de casos forenses é uma das investigações que mais vem exigido avanços, devido ao seu impacto social. Puderam comprovar que a padronização de reações multiplex reduzem erros e tempo e preserva os reagentes.

DEKAIRELLE *et al.*, (2001) realizaram exames de 89 casos aleatórios de violação, incluindo 166 casos onde existiam traços de sêmen. De acordo com o teste de prostatase-antígeno-específico, houve a necessidade de um método mais eficiente de análise. Em 35% das 84 amostras que continham quantidades elevadas das amostras da vítima, isto é, lavagens vaginal/anal e de calcinhas, ocorreu a lise diferencial, não sendo possível detectar STR autossômico masculino. Concluíram que a quantidade de DNA total disponível e a qualidade de DNA extraídos são fundamentais para o sucesso dos casos forenses.

2.3 GENÉTICA POPULACIONAL E UTILIZAÇÃO DE MULTIPLEX

SANTOS *et al.*, (1996) estudaram a distribuição da frequência alélica do microsatélite do locus DYS19 em 317 amostras de DNA humano, dentre elas 54 de indivíduos Caucasianos, 9 de Índios Americanos, 17 de pigmeus Africanos, 48 da Mongólia, 18 da África, 10 da Ásia, 5 da Oceania, 4 indivíduos de origem não conhecida e 152 brasileiros. Verificaram que um grupo de brasileiros caucasianos apresentou um perfil genético semelhante aos Europeus Caucasianos, porém com maior frequência para o alelo 186pb.

KNIJFF *et al.*, (1997) estudaram a distribuição e frequência alélica dos STRs do cromossomo Y (DYS19, DYS388 I/II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393) de 4.000 homens, distribuídos em 48 populações distintas, em 9 regiões geográficas (Austrália, Pacífico, Ásia Oriental do Sul, Ásia Oriental do Norte, Ártico, Ameríndios, Europa, Índia e África). Conseguiram estimar por meio do estudo da descendência dos haplótipos do cromossomo Y, o número de gerações possíveis de serem resgatadas. A média encontrada foi de 1956 gerações ou 49.000 anos, ou seja, 25 anos para cada geração.

BATISTA DOS SANTOS *et al.*, (1999) efetuaram um estudo onde compararam a contribuição relativa do Y-DNA de índios americanos e não-americanos à formação da população urbana da cidade de Belém(PA). A mutação para o *locus* DYS199 nas bases C—T foi de 90%, para os índios americanos. A contribuição de homens indígenas na formação desta população era menor que 5%, visto que a contribuição de mulheres indígenas foi estimada em mais que 50% das seqüências mitocondriais estudadas da mesma população. Concluíram que a contribuição de mulheres indígenas à formação da população de Belém foi 10 vezes maior do que a contribuição de homens indígenas. Concluíram também que estes resultados ajudavam a esclarecer o processo da integração de comunidades indígenas nas sociedades urbanas brasileiras e possivelmente de outros países.

CORTE-REAL (1999) em sua Tese de Doutorado denominada “Estudo Genético-Populacional de Microssatélites Para Aplicação Forense Nos Países Lusófonos”, apresentada na Universidade de Coimbra-Portugal, estudou indivíduos das populações dos Países de Língua Oficial Portuguesa de Angola-Norte, Brasil-Amazonas, Brasil-S.Paulo, Cabo-Verde, Guiné-Bissau, Moçambique-Sul, Portugal-Centro e S.Tomé e Príncipe. Estabeleceu bases de freqüências alélicas, relativamente aos sistemas DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393 e respectivas freqüências haplotípicas. Pôde concluir que, ao serem considerados os marcadores DYS19, DYS389I, DYS389II,

DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393, o sistema DYS392 apresentou valores de diversidade gênica muito baixa nas populações de Angola-Norte, Guiné-Bissau e Moçambique-Sul; que o conjunto dos marcadores DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393 revelou nas populações estudadas, valores de diversidade haplotípica entre 0.9476 e 0.9740 e capacidade discriminativa haplotípica entre 0.6400 e 0.9524; quando efetuadas comparações entre as populações estudadas nos marcadores DYS19, DYS389I, DYS389II, DYS390, DYS391, DYS392 e DYS393, observou, além da existência do grupo formado pelas populações Ibero-Americanas, uma subdivisão do grupo de populações Africanas; nas populações Africanas, constatou uma maior proximidade ao grupo Ibero-Americano na comparação de microssatélites do cromossoma Y do que na comparação de microssatélites autossômicos.

JUNGE & MADEA (1999) analisaram em 102 indivíduos do sexo masculino, não relacionados da Alemanha Ocidental, 5 regiões polimórficas do cromossomo Y (DYS19, DYS389I/II, DYS390, DYS393). Ao verificarem as frequências alélicas, encontraram 5 alelos para o DYS19, 3 alelos para o DYS389I, 7 alelos para o DYS389II, 6 alelos para o DYS390 (alelos 21, 22, 23, 24, 25 e 26) e 6 alelos para o DYS393 (alelos 11, 12, 13, 14, 15 e 16). Constataram a existência de 56 haplótipos diferente, dados semelhantes aos de outras populações européias.

CARVALHO-SILVA *et al.*, (1999) analisaram diversas características que influenciam a baixa variabilidade do microsatellite DYS19 não encontradas na linhagem principal do cromossomo Y de índios Americanos. O DYS19 foi comparado com outras cinco seqüências repetidas de Y dos tetranucleotide (DYS389A, DYS389B, DYS390, DYS391, e DYS393) sem linhagem de DYS199-T. Todos os microsatelites restantes mostraram níveis significativamente mais elevados de variabilidade do que no DYS19. Foi analisada a diversidade do gene e a variação do número de repetições. O DYS19 teve a diversidade elevada nos brasileiros e em diversas outras populações mundiais.

GUSMÃO *et al.*, (1999) lançaram mão de vários métodos técnicos com o intuito de desenvolver um sistema multiplex para amplificar cinco *loci* STR do cromossomo Y em uma mesma reação de PCR: DYS393, DYS19, DYS390, DYS389 I e DYS389 II. Uma escala alélica arranjada em seqüência foi construída com os alelos previamente arranjados em seqüência incluindo, os mais comuns. Um número de condições de reamplificação das escalas alélicas foram testadas. O pentaplex foi avaliado usando duas plataformas diferentes (ABI e ALF) com resultados prometedores. Entretanto, em amostras degradadas, os artefatos não-específicos foram observados no sistema DYS393 na mesma escala dos tamanhos dos alelos reais. Notaram que este sistema poderia também ser utilizado em mulheres sob condições de rigor relativamente baixos não amplificado

na PCR, levando este sistema ao erro em amostras críticas. Esta falta de especificidade poderia ser reduzida, aumentando o rigor das condições de PCR. A escala DYS19 não poderia ser reamplificada como os artefatos que aparecem após algumas reamplificações. Estes artefatos são provavelmente devido a um resvalamento de 2 bp, induzido pela presença de um estiramento da repetição TA nos fragmentos amplificados PCR. Os produtos não-específicos foram anotados também na amplificação de DYS389 I e de DYS389 II, embora fora da escala de outros alelos neste pentaplex. Este pentaplex, recentemente construído, provou ser muito útil em estudos genético da população, porque todos os cinco marcadores STR do cromossomo Y poderiam ser carregados na mesma placa de gel com outro STR singleplex ou multiplex de Y. A utilidade do SRT do cromossomo Y em casuística criminal é evidente em analisar indivíduos azoospermas.

A população da Argentina é composta na maior parte dos povos com ancestrais europeus. As comunidades aborígenes estão no presente muito reduzidas em número e restritas em pequenas e isoladas regiões geográfica. Três comunidades aborígenes (Mapuche, Tehuelche e Wichi) foram selecionadas por SALA *et al.*, (1999) para a investigação dos STRs. A população metropolitana da cidade de Buenos Aires foi analisada, com micro e minisatélites. Estudaram os STRs DYS389II, DYS19, DYS390, DYS391, DYS392, DYS393, dentre outros mini e microssatélites. Como produto das investigações, uma base de dados da

referência foi criada para que fosse usada rotineiramente em testes de paternidade e casuística forense. Constataram que a distribuição de frequência dos alelos foi caracterizada por diferenças significativas dentro e também entre populações diferentes e, em contraste, a distribuição dos minisatellite da população metropolitana não foi significativamente diferente de outras populações caucasianas.

SCHULTES *et al.*, (1999) estudaram cinco amostras de ossos de esqueletos arqueológicos (entre 250 – 3000 anos), duas amostras de esqueletos modernos (3 meses e 8 anos). Utilizaram um multiplex do cromossomo Y STR (sistema DYS19, DYS389 I/II, DYS 390) responsáveis por detectar remanescentes humanos antigos. Uma nova região de *primers* foi elaborada para o DYS389 I/ II, tendo como resultado os produtos encurtados em 94 pb. O DNA antigo foi amplificado para este marcador e puderam concluir que seria possível amplificar o *loci* de Y-STR dos ossos históricos e pré-históricos de até 3.000 anos.

GENE *et al.*, (1999) estudaram a frequência haplotípica de 8 STRs do cromossomo Y (DYS19,DYS388,DYS389 I/II,DYS390,DYS391,DYS392 e DYS 393) em 223 indivíduos do sexo masculino da cidade de Barcelona. Foram encontrados 137 tipos diferentes de alelos, sendo que 108 alelos foram únicos e o mais comum mostrou-se presente em 13% da amostra. Comprovaram que a

análise combinada do polimorfismo dos STRs do cromossomo Y apresenta alta eficiência para diagnóstico, pois encontraram uma capacidade de discriminação de 61,5% e uma diversidade genética de 0,978.

BRENNER *et al.*, (2000) relatou os dados obtidos no melhor arquivo de dados de genética populacional, o ISFH Congress Proceedings, onde tabelas comparativas de alelos/frequência haplotípicas foram obtidas de várias populações (Afro-Portugueses, Chineses, Colombianos, Húngaros, Poloneses, Italianos, Turcos, Austríacos, Espanhois). Porém o estudo do cromossomo Y não foi analisado na população Colombiana.

CARVALHO *et al.*, (2000) efetuaram o estudo em diversos tecidos com diferentes estados de degradação, dos haplótipos do DYS385 de 128 indivíduos do sexo masculino não aparentados do centro de Portugal e puderam constatar que este marcador é muito polimórfico para a população estudada, onde os pares alélicos mais freqüentes foram o 11-14 e 13-14.

CARRACEDO *et al.*, (2001), em um exercício realizado pelo grupo europeu que estuda DNA (EDNAP) no trabalho do programa de STADNAP, isto é, na standardização dos protocolos de DNA que perfila na Europa, que tem como

objetivo avaliar o desempenho de um STR pentaplex do cromossomo Y, incluíram os *loci* DYS19, DYS389 I e II, DYS390 e DYS393 e verificaram a possibilidade de se determinar uniformidade dos resultados que poderia ser conseguida entre diferentes laboratórios europeus. Aos laboratórios foi pedido a análise de cinco Y-STRs, usando o singleplex e as condições multiplex em três amostras de sangue e em um misturaram a mancha (feminino 95% e 5% masculino). Todos os laboratórios relataram os mesmos resultados mesmo para a mancha misturada incluída no exercício. Isto demonstrou a confiabilidade do STR do cromossomo Y que mostram mesmo com formatos multiplex e provou a utilidade de sistemas de Y-STRs para analisar manchas misturadas com um componente masculino total. Foram estudadas 930 amostras masculinas de 10 populações diferentes de Europa que analisaram também todos os *loci* incluídos no pentaplex. Oito destas dez populações incluíram também dados haplotípicos. Concluíram que para uma única análise do gene, a diversidade haplotípica era mais elevada na Alemanha e na Itália e mais baixas em amostras europeias ocidentais da análise dos países e do haplótipo da Finlândia.

RANGEL-VILLALOBOS *et al.*, (2001) estudaram seis STRs do cromossomo Y (DYS 19, DYS 385, DYS 389 I, DYS 390, DYS 391, DYS 393) onde foi efetuada a PCR em 120 homens do nordeste mexicano, onde se permitiu a verificação do efetivo uso dos marcadores do cromossomo Y em casos forenses na população estudada. A frequência alélica para cada STR foi estimada.

Alcançaram os seguintes resultados: Para DYS393, obtiveram diversidade genética em 51.4% e para DYS385 92.5%. A distribuição alélica de Y-STR Mexicana foram similares ($p < 0.05$) a relatos prévios de Hispano-Americanos para DYS19, DYS389/I, DYS390, DYS391 e DYS393. No entanto, os Mexicanos mostraram o mesmo perfil alélico para DYS383 (11/14; 24.4%) considerado para a maioria da população européia. A diferença na distribuição alélica foi observada ($p < 0.01$). A diversidade haplotípica e a capacidade discriminante masculina deste sistema de 6 loci foi de 99.3 e 84.1%, respectivamente. Concluíram que esta metodologia permite o uso efetivo dos 6 marcadores cromossômicos em casuística de medicina legal em estudo populacional. Concluíram também que o sistema STR fornece um grande potencial para identificar homens e linhagens masculinas e podem ser usados confidencialmente em testes de paternidade e análises forenses em uma população mexicana.

GUSMÃO *et al.*, (2000) efetuaram experimentos onde vários métodos foram empregados na tentativa de desenvolver um sistema multiplex para amplificar os loci do cromossomo Y em uma mesma reação de PCR: DYS393, DYS19, DYS390, DYS389 I e DYS389 II. Foi construída uma escala alélica com os alelos previamente arranjados em seqüência, incluindo os mais comuns. Um número de condições de reamplificação das escalas alélicas foram testadas. O pentaplex foi avaliado, usando duas plataformas de análise diferentes (ABI e ALF)

com resultados prometedores. Entretanto, em amostras degradadas, os artefatos não específicos foram observados no sistema DYS393 na mesma escala dos tamanhos que os alelos reais. Constataram que este sistema poderia também ser detectado nas mulheres sob condições de rigor relativamente baixas na amplificação de PCR, fazendo este sistema levar a erros em amostras críticas; a falta de especificidade pode ser reduzida, aumentando o rigor das condições de PCR; a escala DYS19 não pode ser reamplificada devido ao aparecimento de artefatos após algumas reamplificações, provavelmente de um resvalamento de 2pb, induzido pela presença de um estiramento da repetição de TA nos fragmentos amplificados; os produtos não-específicos foram anotados também na amplificação de DYS389 I e de DYS389 II, embora fora da escala de outros alelos neste pentaplex. Concluíram que o pentaplex construído é de grande utilidade em estudos genéticos da população, porque todos os marcadores STR de cinco Y poderiam ser utilizados na mesma pista de um gel com o outro STR singleplex ou multiplex de Y.

RODRIGUEZ-DELFIN (2001) estudaram a variabilidade genética de quatro marcadores do cromossomo de Y e locais da limitação que definem os haplogrupos mitocondriais do DNA de Ameríndios(mtDNA) em uma população Peruana da região dos Andes (língua nativa Quechua-quechua). Ao serem examinados, 54% das amostras pertenciam aos homens. Entre 25 haplogrupos, 12 possuíam um cromossomo Y de Ameríndios. Nos quatro haplotipos definidos

na base dos marcadores DYS287, DYS199, DYS392 e DYS19, três são compartilhados por Ameríndios da Amazônia. Concluíram que existe um direcionamento desobstruído das uniões, com um mistura genética estimada com não-Ameríndios que é 9 vezes mais baixo para mtDNA do que para o DNA do cromossomo Y.

TARAZONA-SANTOS *et al.*, 2001 estudaram a estrutura geográfica da variabilidade do cromossomo Y em populações nativas da América Sul, com o uso do haplogrupo americano nativo de alta frequência alélica definida. Foram estudados em 236 indivíduos o DYS199-T e seis microssatélites ligados ao cromossomo Y (DYS19, DYS389A, DYS389B, DYS390, DYS391, e DYS393). Seguiram o seguinte teste padrão de variabilidade dentro e entre-população emergente da análise de dados do microssatélite: (1) os níveis significativamente mais elevados da exibição das populações Andinas da variabilidade da dentro-população do que as populações orientais de América do Sul; (2) a análise da autocorrelação de espaço sugere uma estrutura geográfica significativa da variabilidade genética cromossomo Y na América do Sul, embora um teste padrão evolucionário típico não poderia categoricamente ser identificado; e (3) as análises da distância genética e a análise da variação molecular sugerem uma homogeneidade maior entre populações Andinas do que entre Não-Andinas. Na base destes resultados, propuseram um modelo para a evolução das linhagens masculinas de índios sul-americanos, envolvendo testes padrões diferenciais do

fluxo genético da tração e do gene. Na parte ocidental do continente, que é associado com a área Andina, as populações apresentaram tamanhos relativamente eficazes e a fluência genética mostrou níveis entre eles, que criaram entre eles uma tendência para a homogenização do pool genético. Em outros aspectos, população estabelecida na região oriental da Amazônia, o platô brasileiro central e a região chaco exibiram uma taxa mais elevada da tração genética e uns níveis mais baixos do gene para fluir, com uma tendência resultante para a diferenciação genética.

OLIVEIRA (2001) efetuou o estudo da frequência alélica em três *locus* do STR do cromossomo Y (390,391,393), em uma população de indivíduos brasileiros leucodermas por meio da padronização de protocolos de coleta e armazenamento de diversos materiais biológicos e estabeleceu rotinas de extração e amplificação do DNA. Encontrou, como resultados, os *loci* DYS390 com frequência nos alelos 21, 22, 23, 24, 25, 26, sendo que o alelo 24 foi o que apresentou maior frequência destes *loci* com 46%. O DYS391 apresentou os alelos 8, 9, 10, 11, 12 e 13, tendo o alelo 11 a prevalência de 37%; o DYS393 os alelos 11, 12, 13, 14 e 15, tendo o alelo 13 apresentado a frequência de 45% deste *locus*. Ao serem comparados os dados com aqueles de outras populações, demonstraram haver individualidade no perfil alélico da população estudada, comprovando que se faz necessário que se verifiquem os padrões dos alelos na população a ser estudada, pois a utilização de alelos de outras populações pode

levar a falsos resultados. Realizou estudo sobre o cromossomo Y e ressaltou que estudo do cromossomo Y pode se utilizado em teste de paternidade, investigações evolutivas e antropológicas e em identificação humana, porém sua aplicação na rotina forense necessita do estabelecimento de parâmetros populacionais prévios que embasarão a determinação das variações alélicas dos diferentes locus para determinada população, dados estes fundamentais para sua utilização na atividade pericial.

COSTA *et al.*, (2002) estudaram a frequência alélica e haplotípica de sete loci SRTs do cromossomo Y (DYS19, DYS388, DYS389 I e II, DYS390, DYS392) de 109 indivíduos do sexo masculino residentes no Rio de Janeiro. De acordo com os estudos, puderam observar 97 diferentes haplótipos e 87 deles foram únicos. Devido à situação geográfica, encontraram algumas semelhanças com a distribuição do cromossomo Y da população Européia de origem latina.

KALUPNIEK (2002) efetuou estudo utilizando na PCR os primers para os loci DYS 385, DYS 389 I/II, DYS 390, DYS 391, DYS 392, DYS 393, DYS 19 em um nanoplex , para a determinação de uma frequência alélica e haplotípica de 250 indivíduos brasileiros geneticamente não relacionados (aproximadamente 50 de cada região geopolítica do país). Encontraram uma diversidade gênica média correspondente ao poder de exclusão de paternidade (PE) de 63,7% . Os loci

mais informativos foram DYS 385I/II, DYS 389 I/II, PE acima de 70% e os menos informativos foram DYS 391 e DYS 393 PE abaixo de 55%. Constatou que a diversidade haplotípica foi de 99,8% e com os haplótipos apresentados indicaram uma participação predominante de indivíduos europeus, sexo masculino, na formação da população brasileira atual. Não detectaram uma diferenciação significativa entre as cinco regiões geopolíticas brasileiras para o haplótipo de nove *loci* STR com base em um teste exato e reamostragem por *bootstrapping* ($F_{st}=0,00031$, valor $p=0,43326$). Ao realizarem o teste AMOVA, encontraram 99,97% da variabilidade haplotípica contida dentro de regiões e apenas 0,03% entre regiões. Concluiu que com o resultado apresentado, em consequência da heterogeneidade genética e formação relativamente recente da população brasileira atual, um banco de dados nacional único de frequências haplotípicas de STR no cromossomo Y pode ser utilizado com segurança para a avaliação quantitativa de identidades em casuística forense em populações brasileiras.

3 PROPOSIÇÃO

O presente trabalho tem como proposição:

- aprimorar a extração do DNA em amostras de sangue, utilizando a Resina Quelante CHELEX 100®;
- aprimorar a PCR utilizando os *primers* para os *loci* DYS 385 I/II, DYS 389 I/II, DYS 390, DYS 391, DYS 392, DYS 393, DYS 19 através da padronização do Nanoplex;
- comprovar a importância do estudo do cromossomo Y nos casos de investigação de paternidade e em casos forenses.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Após a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP (ANEXO A), foram estudadas 25 amostras de sangue de cadáveres do sexo masculino, submetidas ao exame necroscópico no Instituto Médico Legal de Cuiabá - Mato Grosso. (ANEXO B).

A Dissertação foi desenvolvida no Laboratório de DNA da Área de Odontologia Legal e Deontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP e no Laboratório Biologia Molecular- Genoma II / UNICAMP.

4.2 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Os recursos disponíveis para a realização do trabalho foram: FTA® Cards; micropipetas e ponteiros Gilson®; aparelho de vórtex; tubos de Eppendorf®; Tesoura; Pinça; Microcentrífuga; Aparelho de Banho-Maria; Computador; Seqüenciador automático ABI PRISM 377; Equipamentos para eletroforese; Aparelho Termociclador; Aparelho de Ultra-Violeta; Aparelho para purificação de água; Autoclave; Agulha descartável; Freezer; Papel alumínio; Água

Desionizada; Resina Chelex 100®; Primers: DYS 385, DYS 389 I/II, DYS 390, DYS 391, DYS 392, DYS 393, DYS 19; Tampão com magnésio; Taq Polimerase Gold; dNTPs.

4.3. MÉTODO

Para a extração, amplificação e análise dos fragmentos do DNA nuclear das amostras, foram seguidos os mesmos Protocolos sugeridos por CÔRTE-REAL(1999), protocolo fornecido pelo **Y STR Database** <http://ystr.charite.de/> site oficial com dados sobre os estudos realizados sobre os Y-STRs, protocolo fornecido pelo Serviço de Genética e Biologia Forense do Instituto Nacional de Medicina Legal – Delegação Coimbra. Todos com modificações feitas por nós.

As amostras foram colhidas em FTA® Cards e numeradas de acordo com a numeração do laudo do cadáver (para que fosse preservada sua identidade), embrulhadas em papel alumínio individualmente e armazenadas em temperatura ambiente. (ANEXO C)

4.3.1 EXTRAÇÃO DO DNA:

Procedeu-se da seguinte forma: (CORTE-REAL, 1999)

- Numeraram-se os tubos de 01 a 25;

- Cortou-se uma porção do FTA® card (3mm²);
- Adicionou-se a 1ml de água destilada estéril;
- Manteve-se em temperatura ambiente durante 15 a 30 minutos, agitando ocasionalmente;
- Centrifugou-se por 3 minutos (10000-15000xg);
- Eliminou-se o sobrenadante, ficando o restante do material em cerca de 30µl da mistura;
- Adicionou-se 170µl de Chelex® a 5%;
- Incubou-se a 56° durante 15 a 30 minutos em banho maria ;
- Agitou-se em vórtex durante 15 a 10 segundos;
- Incubou-se em banho de água fervente durante 8 minutos;
- Agitou-se em vórtex durante 15 a 10 segundos;
- Centrifugou-se por 3 minutos (10000-15000xg);

4.3.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO

O DNA extraído foi quantificado em um aparelho GENE QUANT®

RNA/DNA

- Em uma cubeta de 10µl, colocou-se 10 µl de água pura (referência -padrão);
- Zeraram-se todos os parâmetros;

- Removeu-se a água e adicionou-se 10µl da amostra desejada;
- Selecionou-se os parâmetros desejados: Quantidade de DNA, Pureza, Absorbância;
- Efetuou-se a limpeza da cubeta e adicionou-se 10µl de água para nova leitura.(a mesma deverá ser zero)

4.3.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction- Reação em Cadeia de Polimerase*)

Para a realização do trabalho, foram utilizados os *primers* registrados na TAB. 01, sendo que, para sua análise, foram utilizadas fluorescências para os *primers* diretos (sense).

Utilizaram-se os seguintes iniciadores (*primers*) sintetizados por Applied Biosystem com a marcação fluorescente indicada como DYS19 F: NED, DYS389 F: NED, DYS390 F: 6-FAM, DYS393 F:NED , DYS392 F:NED, DYS385 F: 6-FAM.

Após seguidas as recomendações do ISFH e testados os protocolos sugeridos por ELMOZNINO&PRINZ (2001), várias tentativas foram realizadas até o êxito na padronização para os reagentes e equipamentos que possuíamos. Lançou-se mão de misturas preparativas da reação com os seguintes elementos e nas quantidades referidas (por amostra):

Locus	Repeat Motif	# Repeats	# Alleles	Allele size ranges (bp)	Gene Diversity (h)	PCR Primer Sequences
DYS19	(GATA) _n	10-19	9	174-210	0.72	Primer A: C T A C T G A G T T C T G T T A T A G T Primer B: A T G G C A T G T A G T G A G G A C A Primer A2: G T T A T A T A T A T A G T G T T T A G ³⁾ Primer B2: G T T A A G G A G A G T G T C A C T A ³⁾
DYS389I ¹⁾	(GATA) _n (GACA) _n	9-16	7	235-263	0.61	Primer A: C C A A C T C T C A T C T G T A T T A T C T A T Primer B: T C T T A T C T C C A C C A C C A G A Primer 2B: T T A T C C C T G A G T A G T A G A A G A T ⁵⁾
DYS389II ¹⁾	(GATA) _n (GACA) _n	26-33	8	355-383	0.75	see DYS389I
DYS390	(GATA) _n (GACA) _n	18-27	9	191-227	0.61	Primer A: T A T A T T T A C A C A T T T T T G G G C C Primer B: T G A C A G T A A A A T G A A C A C A T T G C
DYS391	(GATA) _n	7-14	8	271-299	0.49	Primer A: C T A T T C A T T C A A T C A T A C A C C C A Primer B: G A T T C T T T G T G G T G G G T C T G
DYS392	(ATT) _n	6-16	11	233-263	0.52	Primer A: T C A T T A A T C T A G C T T T T A A A A C A A Primer B: A G A C C C A G T T G A T G C A A T G T
DYS393	(GATA) _n	9-16	8	108-136	0.34	Primer A: G T G G T C T T C T A C T T G T G T C A A T A C Primer B: A A C T C A A G T C C A A A A A T G A G G
DYS385	(GAAA) _n	7-22	68	352-412	0.85	Primer A: A G C A T G G G T G A C A G A G C T A Primer B: G G G A T G C T A G G T A A A G C T G Primer 2B: C C A A T T A C A T A G T C C T C C T T C ⁴⁾
YCAII ²⁾	(CA) _n	1-9	31	144 - 160	0.67	Primer A: T A T A T T A A A T A G A A G T A G T G A Primer B: T A T C G A T G T A A T G T T A T A T T A

Tabela nº01- Características dos Primers utilizados

Nanoplex

- 1,6 µl de PCR Buffer;
- 1,0µl dNTP's (10mM)
- 1,0µl de cada iniciador DYS;
- 1,6µl BSA (10X)

Procedeu-se da seguinte forma:

- colocou-se dH₂O para um volume final de 50µl em cada tubo de amostra;
- aqueceu-se a 95°C durante 5 minutos a mistura preparativa da reação necessária;
- arrefeceu-se em gelo;
- adicionou-se AmpliTaq Gold® na quantidade de 0,8 µl por amostra;
- repartiu-se em quantidades iguais da mistura anterior por cada tubo de amostra;
- adicionou-se 5 µl de DNA.

A amplificação foi efetuada no termociclador da Perkin-Elmer PE9600, nas seguintes condições:

Hot Start: 95°C por 10 minutos (para a ação da AmpliTaqGold®)

- 30 ciclos:
 - 94°C durante 1 minuto;
 - 52°C durante 2 minutos;
 - 68°C durante 2 minutos;
- 60°C durante 75 minutos.

4.3.4 ELETROFORESE

Para a aplicação no gel, foi preparada uma solução com 0.5 µl de Genescan Rox 500 x n+1 amostras, 0.5 µl de tampão (loading buffer) x n+1 amostras e 2.5 µl de formamida x n+1 amostras. Foram repartidos 3.5 µl da solução por tubo e adicionados 2 µl de produto amplificado. Após agitação no vortex, centrifugação, desnaturação a 90°C durante 2 min. e arrefecimento em gelo, aplicou-se 1.5 µl.

4.3.5 DESIGNAÇÃO ALÉLICA

Para designação alélica dos microssatélites, seguiu-se o trabalho de CORTE-REAL (1999), juntamente com o Programa GENETYPED® para análise dos fragmentos, onde foi considerado o número de unidades de repetição completas e nas unidades de repetição incompletas, atendendo ao número de pares de bases da repetição parcial separadas por um ponto decimal.

5 RESULTADOS

5.1 ARMAZENAMENTO DO DNA

O armazenamento das amostras de sangue em FTA® Cards mostrou-se prático, seguro e eficaz, pois há contato excessivo com o sangue total, evitando, assim, contaminação da amostra e do profissional que a manuseia, possui local para a identificação da mesma, evitando assim a troca de amostras ao executar o exame. O fato de poderem ser armazenadas em temperatura ambiente é de importante relevância quanto ao transporte das amostras sem a necessidade de um acondicionamento de temperatura (fator este vulnerável ao se transportar uma amostra para lugares distantes). Algumas amostras mostraram-se com uma coloração diferente da maioria e, ao serem analisadas, mostraram resultados negativos.

5.2 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA nos forneceu uma quantidade de DNA satisfatória para a execução da PCR, com um grau de pureza aceitável para a análise. (TAB.

2)

Amostra	Absorbância	DNA	Pureza	Proporção
553/01	3	0,15	55%	0,15
556/01	0,798	0,08	56%	1,024
558/01	3	0,15	55%	0,15
562/01	3	0,15	55%	0,15
568/01	3	0,169	55%	1
573/01	3	0,3	55%	1
729/01	0,494	0,049	54%	0,972
733/01	1,049	0,105	53%	0,968
774/01	2,731	0,137	53%	0,963
785/01	0,987	0,049	53%	0,049
805/01	1,581	0,079	53%	0,079
854/01	0,357	0,018	52%	0,945
728/01	1,786	0,088	50%	0,904
767/01	1,56	0,074	50%	0,903
771/01	0,64	0,034	50%	0,901
772/01	1,659	0,166	49%	0,888
803/01	1,455	0,073	48%	0,073
804/01	2,111	0,097	48%	0,877
827/01	0,947	0,042	48%	0,879
849/01	2,769	0,131	47%	0,131
874/01	2,357	0,236	47%	0,85
876/01	2,037	0,102	47%	0,102
893/01	1,158	0,058	47%	0,058
894/01	0,276	0,01	47%	0,848
913/01	1,112	0,057	47%	0,855

Tabela nº2. Resultado da Quantificação

5.3 PCR NANOPLEX

Mostrou-se eficaz, pois foi possível determinar os alelos da população estudada.

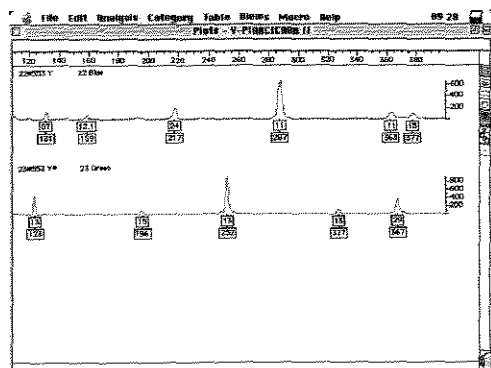


Figura nº 4 – Cromatograma amostra 553/01

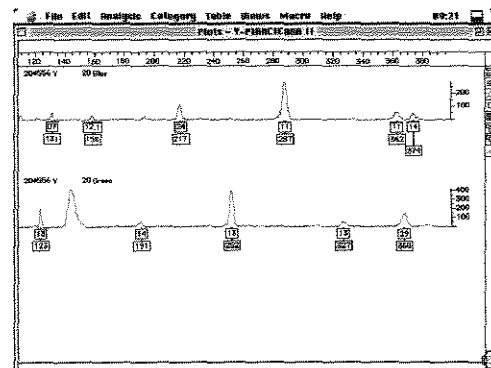


Figura nº 5 – Cromatograma amostra 556/01

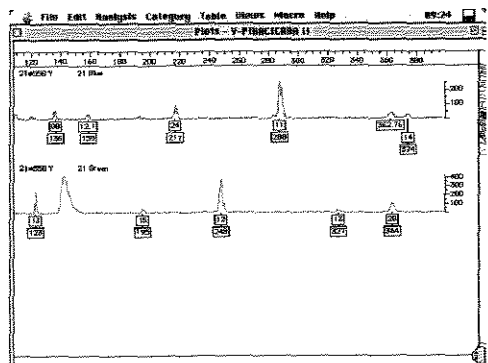


Figura nº 6 – Cromatograma amostra 558/01

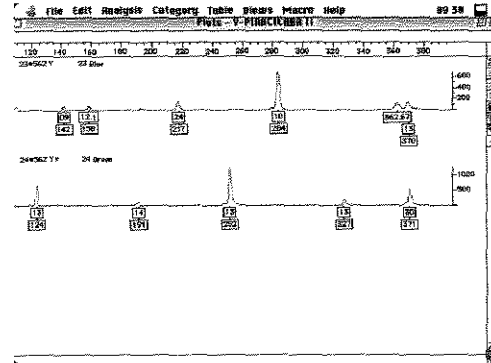


Figura nº 7 – Cromatograma amostra 562/01

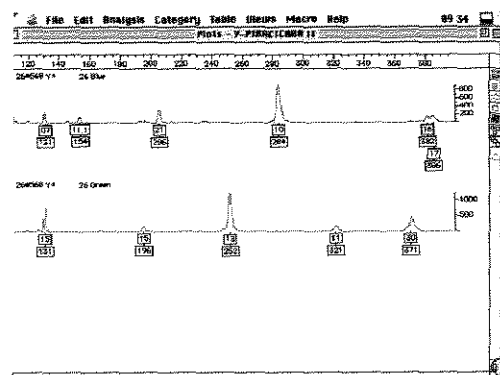


Figura nº 8 – Cromatograma amostra 568/01

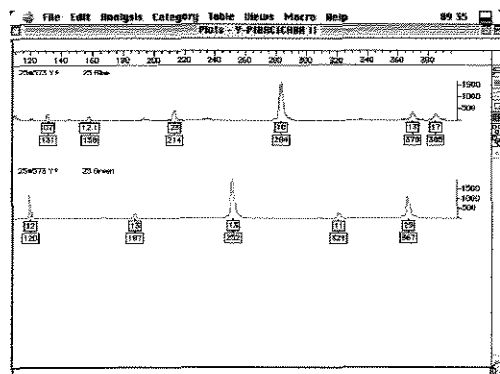


Figura nº 9 – Cromatograma amostra 573/01

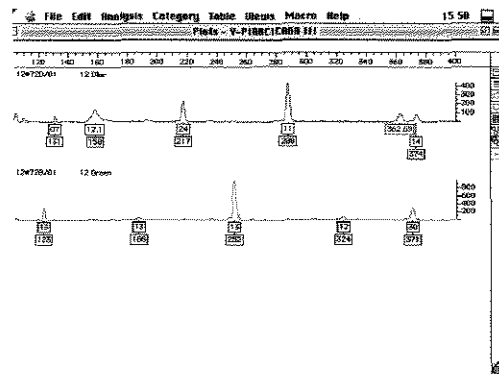


Figura nº 10 – Cromatograma amostra 728/01

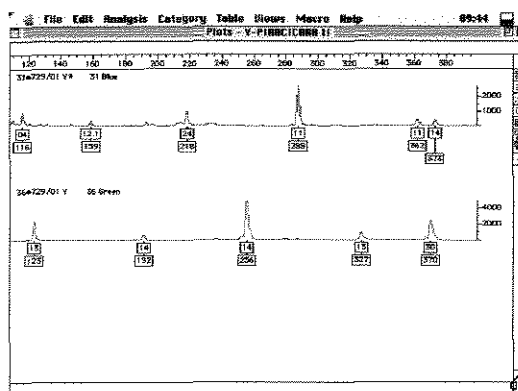


Figura nº 11 – Cromatograma amostra 729/01

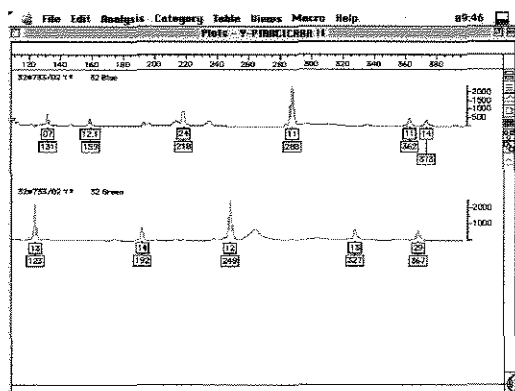


Figura nº 12 – Cromatograma amostra 733/01

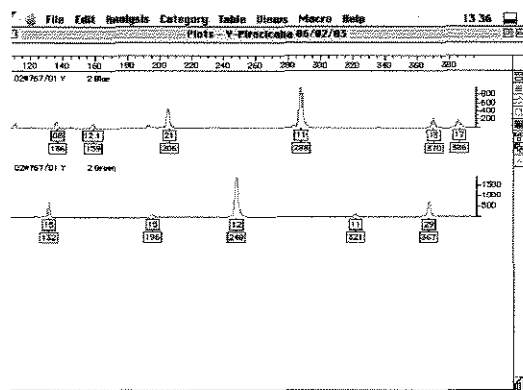


Figura nº 13 – Cromatograma amostra 767/01

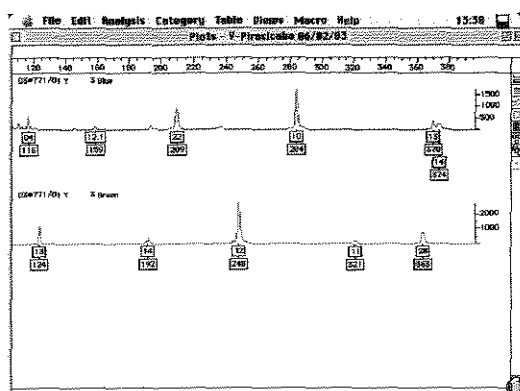


Figura nº 14 – Cromatograma amostra 771/01

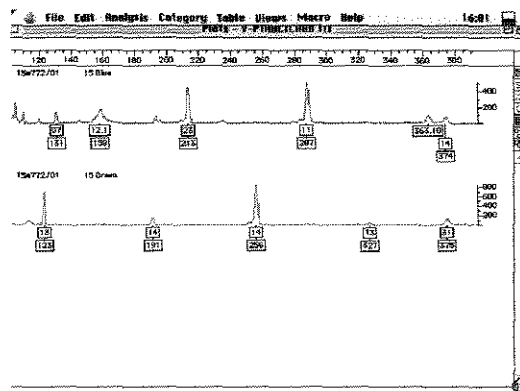


Figura nº 15 – Cromatograma amostra 772/01

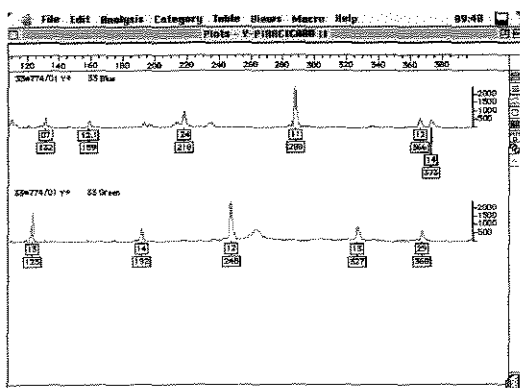


Figura nº 16 – Cromatograma amostra 774/01

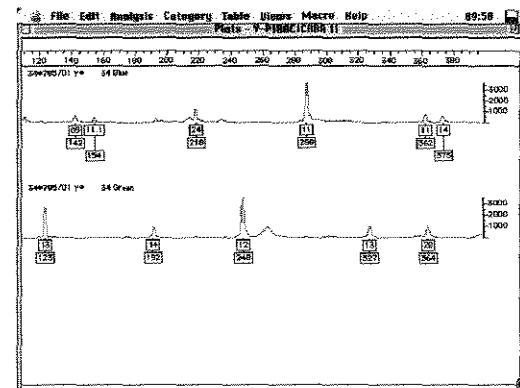


Figura nº 17 – Cromatograma amostra 785/01

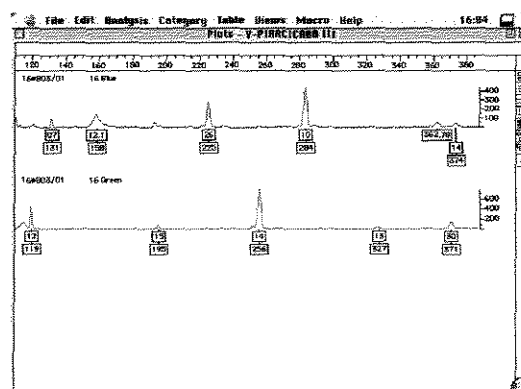


Figura nº 18 – Cromatograma amostra 803/01

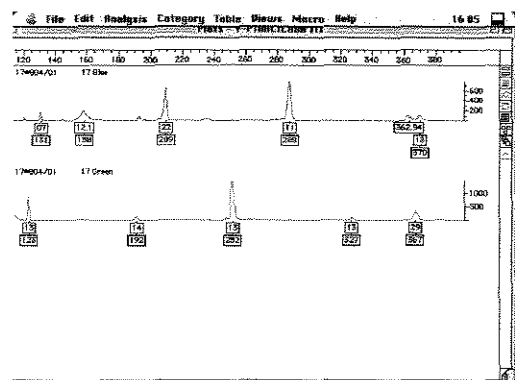


Figura nº 19 – Cromafotograma amostra 804/01

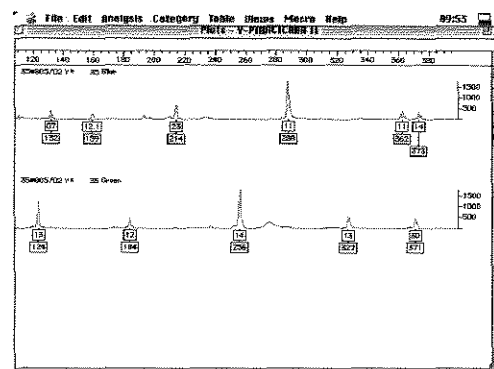


Figura nº 20 – Cromafotograma amostra 805/01

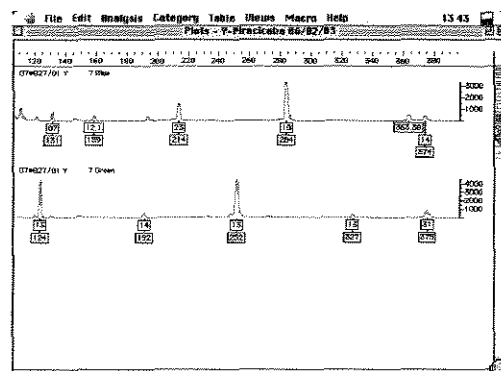


Figura nº 21 – Cromafotograma amostra 827/01

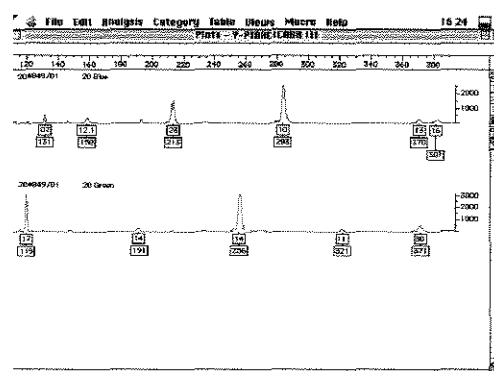


Figura nº 22 – Cromafotograma amostra 849/01

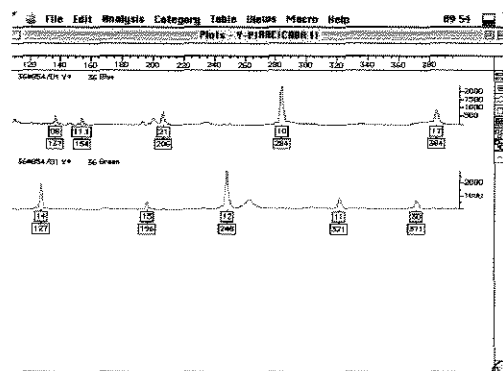


Figura nº 23 – Cromafotograma amostra 854/01

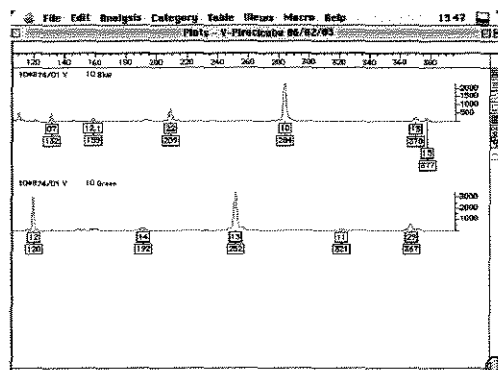


Figura nº 24 – Cromatograma amostra 874/01

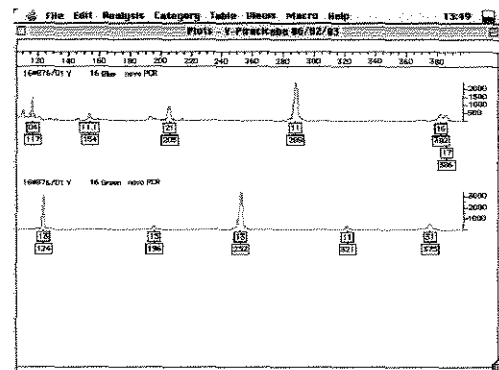


Figura nº 25 – Cromatograma amostra 876/01

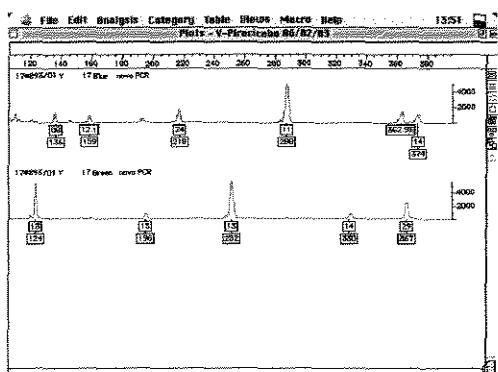


Figura nº 26 – Cromatograma amostra 893/01

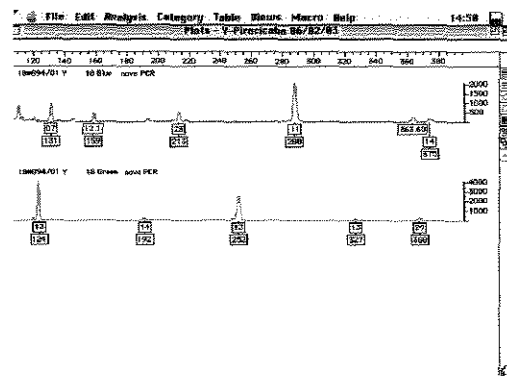


Figura nº 27 – Cromatograma amostra 894/01

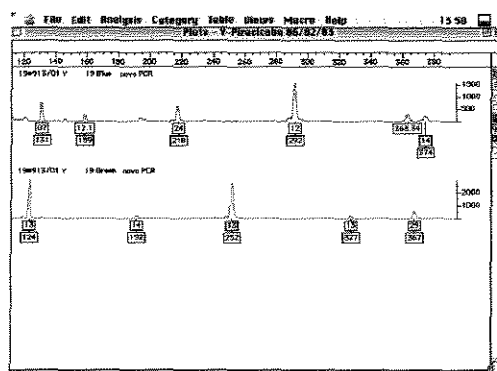


Figura nº 28 – Cromatograma amostra 913/01

5.4 .DESIGNAÇÃO ALÉLICA:

5.4.1. Sistema DYS19:

Amostra	Alelos
553/01	15
556/01	14
558/01	15
562/01	14
568/01	15
573/01	13
729/01	14
733/02	14
774/01	14
785/01	14
805/02	12
854/01	15
728/01	13
767/01	15
771/01	14
772/01	14
803/01	15
804/01	14
827/01	14
849/01	14
874/01	14
876/01	15
893/01	15
894/01	14
913/01	14

Tabela nº 3. Designação Alélica observada no sistema DYS19

5.4.2 Sistema DYS389I:

Amostra	Alélos
553/01	13
556/01	13
558/01	12
562/01	13
568/01	13
573/01	13
729/01	14
733/02	12
774/01	12
785/01	12
805/02	14
854/01	12
728/01	13
767/01	12
771/01	12
772/01	14
803/01	14
804/01	13
827/01	13
849/01	14
874/01	13
876/01	13
893/01	13
894/01	13
913/01	13

Tabela nº 4. Designação Alélica observadas no sistema DYS389I

5.4.3 Sistema DYS389II:

Amostra	Alelos
553/01	29
556/01	29
558/01	28
562/01	30
568/01	30
573/01	29
729/01	30
733/02	29
774/01	29
785/01	28
805/02	30
854/01	30
728/01	30
767/01	29
771/01	28
772/01	31
803/01	30
804/01	29
827/01	31
849/01	30
874/01	29
876/01	31
893/01	29
894/01	29
913/01	29

Tabela nº5. Designação Alélica observadas no sistema DYS389II

5.4.4 Sistema DYS390:

Amostra	Alelos
553/01	24
556/01	24
558/01	24
562/01	24
568/01	21
573/01	23
729/01	24
733/02	24
774/01	24
785/01	24
805/02	23
854/01	21
728/01	24
767/01	21
771/01	22
772/01	23
803/01	26
804/01	22
827/01	23
849/01	23
874/01	22
876/01	21
893/01	24
894/01	23
913/01	24

Tabela nº6. Designação Alélica observadas no sistema DYS390

5.4.5. Sistema DYS391:

Amostra	Alélos
553/01	11
556/01	11
558/01	11
562/01	10
568/01	10
573/01	10
729/01	11
733/02	11
774/01	11
785/01	11
805/02	11
854/01	10
728/01	11
767/01	11
771/01	10
772/01	11
803/01	10
804/01	11
827/01	10
849/01	10
874/01	10
876/01	11
893/01	11
894/01	11
913/01	12

Tabela nº7. Designação Alélica observada no sistema DYS391

5.4.6. Sistema DYS392:

Amostra	Alélos
553/01	13
556/01	13
558/01	13
562/01	13
568/01	11
573/01	11
729/01	13
733/02	13
774/01	13
785/01	13
805/02	13
854/01	11
728/01	12
767/01	11
771/01	11
772/01	13
803/01	13
804/01	13
827/01	13
849/01	11
874/01	11
876/01	11
893/01	14
894/01	13
913/01	13

Tabela nº8. Designação Alélica observada no sistema DYS392

5.4.7. Sistema DYS393:

Amostra	Alélos
553/01	13
556/01	13
558/01	13
562/01	13
568/01	15
573/01	12
729/01	13
733/02	13
774/01	13
785/01	13
805/02	13
854/01	14
728/01	13
767/01	15
771/01	13
772/01	13
803/01	12
804/01	13
827/01	13
849/01	12
874/01	12
876/01	13
893/01	13
894/01	13
913/01	13

Tabela nº 9. Designação Alélica observada no sistema DYS393

5.4.8. Sistema DYS385 I:

Amostra	Alélos
553/01	11
556/01	11
558/01	11
562/01	11
568/01	16
573/01	13
729/01	11
733/02	11
774/01	12
785/01	11
805/02	11
854/01	17
728/01	11
767/01	13
771/01	13
772/01	11
803/01	11
804/01	11
827/01	11
849/01	13
874/01	13
876/01	16
893/01	11
894/01	11
913/01	11

Tabela nº10. Designação Alélica observada no sistema DYS385 I

5.4.9. Sistema DYS385 II:

Amostra	Alélos
553/01	15
556/01	14
558/01	14
562/01	13
568/01	17
573/01	17
729/01	14
733/02	14
774/01	14
785/01	14
805/02	14
854/01	17
728/01	14
767/01	17
771/01	14
772/01	14
803/01	14
804/01	13
827/01	14
849/01	16
874/01	15
876/01	17
893/01	14
894/01	14
913/01	14

Tabela nº 11. Designação Alélica observada no sistema DYS385 II.

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, a Sociedade Internacional de Genética Forense (Anexo D) publicou uma série de documentos que são verdadeiros guias de procedimentos e de recomendações a respeito da aplicação de polimorfismos do DNA aos problemas da identificação humana. Este último relatório dirigiu-se a uma área relativamente nova, o polimorfismo do cromossomo Y, com ênfase em particular para as curtas repetições seguidas uma após a outra (STRs). Neste relatório, continha a nomenclatura, uso de escadas alélicas, genética da população e métodos de divulgação (GILL *et al.* 2001).

Devido a sua variabilidade intrapopulacional, o estudo dos microssatélites do cromossomo Y demonstra uma significativa utilidade nas casuísticas forenses. Com o estudo de diferentes marcadores, com diferentes mutações, pode-se chegar a um estudo mais completo da evolução histórica masculina (ZERJAL *et al.*, 1997; ROEWER, 1998).

Para BÄR *et al.*, segundo CORTE-REAL (1999); CARRACEDO *et al.* (1997); JOBLING *et al.* (1997); KAYSER *et al.* (1997), na resolução de perícias que envolvem a genética forense, fica indiscutível a utilização de microssatélites, porém faz-se necessário o estabelecimento de bases de dados populacionais, não

só dos microssatélites autossômicos, mas também dos microssatélites do cromossomo Y.

6.1 ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS EM FTA® Blood Cards

FTA® Blood Cards são cartões para armazenamento de manchas de sangue que passaram por um tratamento químico, que permite a isolamento rápida do DNA puro. Quando as amostras são aplicadas nestes cartões tratados, as membranas celulares e organelas sofrem lise e o DNA de peso molecular elevado é imobilizado dentro da matriz. A digestão da enzima da amplificação ou da limitação pode ser executada diretamente no papel tratado sem a necessidade de procedimentos extensivos da extração. Através do isolamento rápido do DNA puro, impede a colonização por bactérias ou por fungos. Protege as amostras da degradação ambiental e microbiana. As amostras podem ser transportadas e armazenadas em temperatura ambiente. Podem ser armazenadas por dez anos em temperatura ambiente.

As amostras utilizadas para a realização deste trabalho foram

armazenadas em temperatura ambiente por 06 meses e não sofreram alteração. Vários pesquisadores utilizaram este método de armazenamento de amostras (CARVALHO, 1999; CORTE-REAL, 1999; KLINTSCHAR, 1999; VANEK, 2001;) e muitos laboratórios o utilizam (FBI-USA, Instituto Nacional de Medicina Legal-Delegação Coimbra, Serviço de Genética e Biologia Forense, GENOMIC) e todos com êxitos.

6.2 EXTRAÇÃO POR CHELEX100®

A extração do DNA através de Chelex100® foi desenvolvida para extração de DNA de amostras forenses e para serem usadas em PCR. Tem a vantagem de ser um processo rápido, simples e não envolve solvente orgânico e não necessita de muitos procedimentos, diminuindo assim, o risco de contaminação (WALSH *et al.*, 1991). Elimina certos inibidores da PCR e permite a separação do DNA em cadeias simples (desnaturação). (BUDOWLE & BROWN, 2001)

É uma resina quelante que contém polímeros de esteril divinilbenzeno e íons iminodiacetato que atuam como grupos que queletam ligando-se a íons

metálicos polivalentes. Possui a capacidade de eliminar contaminantes metálicos, conferindo um nível elevado de pureza, sem afetar a concentração dos íons não metálicos (WALSH *et al.*, 1991).

O Chelex 100® possui uma seletividade particularmente elevada por íons bivalentes e diferente dos vulgares “íons exchanges” pois possui uma alta afinidade para os íons metálicos e para suas pontes de ligação. O primeiro passo da extração (lavagens com água destilada), envolve a remoção de possíveis contaminantes e inibidores, tais como o grupo “Heme” da hemoglobina e outras proteínas. Este passo aplica-se ao sangue e as manchas de sangue, mas não é necessário para amostra de tecido e osso. A alcalinidade do Chelex100® suspenso (pH 10-11) e exposto a uma temperatura de 100°C resulta na ruptura da membrana celular e desnaturação do DNA. A centrifugação é responsável pela deposição dos núcleos no fundo do tubo, enquanto no sobrenadante fica a hemoglobina arrebatada (WALSH *et al.*, 1991).

A extração das manchas de sangue humano utilizadas no trabalho com a resina quelante Chelex100® mostrou-se rápido e de fácil manuseio, agilizando o processo de extração. Um cuidado maior foi necessário ao retirar a quantidade de DNA necessária para a execução da PCR, pois caso fosse colhida junto com a

amostra, a resina inibiria a reação de PCR, não se obtendo o resultado desejado da reação.

O êxito em sua utilização vem sendo mostrado em inúmeros trabalhos de estudo populacional (ROSSI *et al.*, 1998; NATA *et al.*, 1999; KLINTISCHAR *et al.*, 1999; LESSIG & EDELMANN, 2001; SIBILLE *et al.*, 2002), exames de paternidades e em casuísticas forenses (GILL *et al.*, 2000).

6.3 PCR (*Polimerase Chain Reaction*)

Técnica desenvolvida por Kary Mullis, final da década de 80, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) caracteriza-se na construção de cópias (amplificação enzimática) *in vitro* de seqüências de regiões hipervariáveis (JARRETA, 1999) que ao unir-se com um iniciador (*primer*), nucleotídeos, pequena quantidade de DNA genômico, solução tampão e submetido a variações de temperatura efetuará a síntese. Ocorrerão então três etapas distintas: Desnaturação (ocorre o aumento da temperatura na máquina, geralmente 94°C por 5 minutos, para que haja a separação das fitas de DNA. Esta temperatura

varia conforme o número de nucleotídeos que compõem a cadeia, logo, o número de pontes de hidrogênio.); Anelamento (ocorre a queda da temperatura da máquina, geralmente 30 a 65°C por 30 segundos, os *primers* ligam-se então às duas extremidades das fitas.); Extensão (ocorre nova elevação da temperatura, geralmente 72°C por 2 a 5 minutos, promovendo a união dos nucleotídeos um a um nas fitas -em sentidos opostos-, processo catalisado pela polimerase do DNA, promovendo a formação de novas cadeias.)(FARAH,1999; OZAKI,1999)

Através da ação da enzima polimerase do DNA, são adicionados os nucleotídeos presentes na reação para a síntese de novas cadeias semelhantes ao molde de fita simples de DNA (FARAH, 1997). Em casos onde existe a contaminação do DNA, como nos casos de manchas orgânicas, apenas o DNA humano será reconhecido pela complementariedade de bases dos oligonucleotídeos (*Primers*) (SANTOS, 1999).

O polimorfismo é observado graças às diferenças de peso molecular entre os fragmentos da região-alvo amplificada, decorrentes de pequenas repetições seguidas (STR).(TAB. 12)

Sistema	Unidade de Repetição(UR)	Localização	Pares de bases (pb)	Nº de repetições	Nº de alelos
DYS19	[CTAT] _n	pY	174-210	10-19	10
DYS385	[GT?A] _n	qY	353-405	1-13	13
DYS389I	[CTAT] _n	qY	239-263	7-13	7
DYS389II	[CTAT/CTGT] _n	qY	353-385	23-31	9
DYS390	[CTAT] _n	qY	195-227	5-14	10
DYS391	[CTAT] _n	qY	275-291	8-13	6
DYS392	[ATT] _n	qY	236-263	7-16	8
DYS393	[GATA] _n	qY	116-132	11-15	5

Tabela nº 12 – Características particulares de cada marcador do cromossomo Y estudado

Existem na literatura inúmeros trabalhos que comprovaram a eficácia da utilização de multiplex (KAYSER *et al.*, 1997; KNIFF *et al.*, 1997; PRINZ *et al.*, 1997; ROSSI *et al.*, 1998; GENÉ *et al.*, 1999; CORTE-REAL, 1999; GUSMÃO *et al.*, 1999; GILL, 2000; GUSMÃO *et al.*, 2000; REICHENPFADER *et al.*, 2000; CARRACEDO *et al.*, 2001; CORACH *et al.*, 2001; ALER *et al.*, 2001; STERLINKO, 2001; BUTLER, 2002; BOSCH *et al.*, 2002; KALUPNIEK, 2002), podendo ser desde um duplex (utilizando dois pares de *primers*), até nanoplex (utilizando nove pares de *primers*). Não se pode ignorar a utilização de um monoplex (um par de *primers*), porém faz-se necessário o estudo de um maior número de *locus* possível para se chegar a um resultado satisfatório, devido ao aumento do grau de

polimorfismo estudado. Cabe a cada laboratório efetuar testes para a sua padronização, utilizando, assim, o melhor método encontrado e adaptado, devendo-se levar em consideração os meios de manipulação do material, condições em que são encontradas as amostras, biossegurança e custos.

Quando se trata de estudos de investigação de filiação, tem-se a possibilidade de conseguir uma amostra de sangue com quantidade e qualidade suficientes para se permitir uma análise de vários tipos de marcadores (diferentes multiplex, ou variados monoplex). Já nos casos de criminalística, muitas vezes apenas possuímos amostras degradadas ou com pequena quantidade de DNA, o que impossibilita o estudo dos marcadores tradicionais, onde a aplicação dos polimorfismos do DNA passou a ser um fator de fundamental importância na resolução deste tipo de perícias.

A utilização de polimorfismos de DNA, em casos de criminalística ou de investigações de filiação, permitiu uma evolução extremamente significativa das ciências forenses. (CORTE-REAL, 1999)

Nos últimos anos, a Sociedade Internacional de Genética Forense (ISFG) vem estabelecendo padrões internacionais para a execução de exames de paternidade. Assim, criou-se o PTC (Comissão de Testes de Paternidade), que

recomenda que os exames de investigação de paternidade devem seguir os padrões ISO 17025 (MORLING *et al.*, 2002).

Neste trabalho, não foram executados os estudos das frequências alélicas, nem da diversidade haplotípica, pois foram estudadas 25 amostras de sangue humano e, para que seja realizado um estudo populacional, cada laboratório para conhecimento da frequência alélica dos locus de STRs deve realizar o estudo de pelo menos 100 indivíduos, devendo-se levar em consideração, então, a sensibilidade, identificar os com maior polimorfismo, elevado índice de discriminação e de heterozigose, assim como de baixa frequência de mutações (JOBIM *et al.*, 1999).

De acordo com os resultados encontrados (para o locus DYS19, os alelos 12, 13, 14, 15, sendo que o alelo 14 foi o mais freqüente; para o locus DYS389 I, os alelos 12, 13 e 14, sendo que o alelo 13 foi o mais freqüente; para o locus DYS389 II, os alelos 28, 29, 30, e 31, sendo que o alelo 29 foi o mais freqüente; para o locus DYS390, os alelos 21, 22, 23, 24 e 26, sendo que o alelo 24 foi o mais freqüente; para o locus DYS391, os alelos 10, 11 e 12, sendo que o alelo 11 foi o mais freqüente; para o locus DYS392, os alelos 11, 12, 13 e 14, sendo que o alelo 13 foi o mais freqüente; para o locus DYS393, os alelos 12, 13, 14 e 15, sendo que o alelo 13 foi o mais freqüente; para o locus DYS385 I, os alelos 11, 12, 13, 16 e 17, sendo que o alelo 11 foi o mais freqüente; para o locus

DYS385 II, os alelos 13, 14, 15, 16 e sendo que o alelo 14 foi o mais freqüente), em comparação com os resultados encontrados em outros estudos da população brasileira verificou-se existir individualidade no perfil alélico da população estudada, confirmando os resultados obtidos por OLIVEIRA(2001), onde se faz necessária a verificação dos padrões dos alelos na população a ser estudada, pois a utilização de alelos de outras populações pode levar a falsos resultados.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos e dentro das condições experimentais empregadas neste trabalho, pôde-se concluir que:

- a extração do DNA das amostras de sangue, utilizando a Resina Quelante CHELEX100®, é satisfatória, pois nos fornece uma quantidade de DNA adequada para análise;
- a reação de Nanoplex foi representativa, pois foram utilizados menores quantidades de reagentes, houve menor manipulação das amostras e os alelos mais encontrados foram: alelo 14 (DYS19); alelo 11 (DYS385I); alelo 14 (DYS385II); alelo 13 (DYS389I); alelo 29 (DYS389II); alelo 24 (DYS390); alelo 11 (DYS391); alelo 13 (DYS392); alelo 13 (DYS393);
- por meio dos estudos levantados, ficou indiscutivelmente comprovada a importância do estudo do cromossomo Y nos casos de investigação de paternidade e em casos forenses, desde que haja um prévio estudo populacional.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALER, M. *et al.* Y-chromosome STR haplotypes from a Western Mediterranean population sample. **Forensic Sci Int**, Suíça, n. 119, p.254-257, Jun. 2001

BARROS DE CASTRO, I.A. *et al.* Allele Frequency Distributions for Twelve STR Loci In a Brazilian Population. **J Forensic Sci**, v. 45, n. 2, p. 941, Jul. 2000

BETZ, A. *et al.* DYS STR analysis with epithelial cells in a rape case. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n. (2-3), p. 126-30, May. 2001

BOSCH, E. *et al.* Y chromosome STR Haplotypes in four populations from northwest Africa. **Int J Legal Med**, Alemanha, v.114, n. 1-2, p.36-40, 2000

BRINTON, K. LIEBERMAN, K. **Basics of DNA Fingerprinting**. 1994 Disponível em: <<http://www.biology.washington.edu/fingerprint/dnaintro.html>> Acesso em 14 jun. 2001

Baseada na NBR-6023 de ago. de 2000, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

Abreviatura dos títulos dos periódicos em conformidade com o MEDLINE.

BUTLER, J.M. *et al.* Quality control of PCR primers used multiplex STR amplification reactions. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 119, n. (1), p.87-96, Jun. 2001

CAGLIA, A. *et al.* Increased forensic efficiency of a STR-based Y-specific haplotype by addition of the highly polymorphic DYS385 locus. **Int J Legal Med**, Alemanha, v. 111, n. 3, p. 142-146, Apr. 1998

_____, CONSELHO FEDERAL DE ODONTOLOGIA (CFO), Resolução CFO-209/1997, Rio de Janeiro, 1997

CARRACEDO, A. *et al.* Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding the reproducibility and robustness of the Y-chromosome STRs DYS19, DYS389 I and II, DYS390 and DYS393 in a PCR pentaplex format. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 119, n. 1, p.28-41, Jun. 2001

CARVALHO-SILVA, D.R, PENA, S.D, Molecular Characterization And Population Study Of An X Chromosome Homolog Of The Y-Linked Microsatellite DYS391. **Gene**, Suíça, v. 247, n.(1-2), p.233-240, Apr. 2001

CARVALHO-SILVA, D.R, *et al.* Divergent Human Y-Chromosome Microsatellite Evolution Rates. **J Mol Evol**, Alemanha, v. 49, n. (2), p.204-214, Aug. 1999

CASTRO, I.A.B. *et al.* Distribuição da Frequência Alélica para loci de 29 STR em uma População Brasileira. **J Forensic Sci**, Alemanha, v. 45, n. (4), p.941, Jul. 2000

CORACH, D. *et al.* Routine Y-STR Typing in Forensic Casework. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n. (2-3), p.131-135, May . 2001

CORACH, D. *et al.* Online Reference Database Of European Y-Chromosomal Short Tandem Repeat (STR) Haplotypes. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n.(2-3) , p.106-13, May. 2001

DEKAIRELLE, A.F. HOSTE, B. Application Of A Y-STR-Pentaplex PCR (DYS19, DYS389 I and II, DYS390 And DYS393) to Sexual Assault Cases. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n. (2-3), p.122-5, May. 2001

FARAH, S.B. **DNA Segredos & Mistérios**. São Paulo, Sarvier, 1997,

FORSTER, P. *et al.* A Short Tandem Repeat-Based Phylogeny For The Human Y Chromosome. **Am J Hum Genet**, Estados Unidos da América, v. 67, n. (1), p.182-96, Jul. 2000

FORSTER, P. *et al.* Phylogenetic resolution of complex mutational features at Y-STR DYS390 in aboriginal Australians and Papuans. **Mol Biol Evol**, Estados Unidos da América, v.15, n.(9), p.1108-14, Sep. 1998

GATTÁS, G.J.F. *et al.* Diagnóstico do Sexo em Crostas de Sangue através da Identificação da Cromatina Y: Aplicação Médico-Legal. **Ver Paul Méd**, Brasil, v.118, n. (2), p.78-82, mar-abr. 1990

GENE, M. *et al.* Haplotype frequencies of eight Y-chromosome STR loci in Barcelona (North-East Spain). **Int J Legal Med**, Alemanha, v. 112, n. (6), p.403-5, 1999

GILL, P. *et al.* DNA Commission Of The International Society Of Forensic Genetics: Recommendations On Forensic Analysis Using Y-Chromosome STRs. **Int J Legal Med**, Alemanha, v. 114, n. (6), p.305-9, 2001

GRAW, M.; SEITZ, T. Y chromosomal short tandem repeat (STR) loci in a representative group of males living in South Württemberg: a database for application in forensic medicine. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 113, n.(1-3), p.43-6, Sep. 2000

GUSMÃO, L. *et al.* Alternative Primers for DYS391 Typing: Advantages of Their Application to Forensic Genetics. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 112, n.(1), p.49-57, Jul. 2000

GUSMÃO, L. *et al.* Robustness of the Y STRS DYS19, DYS389 I AND II, DYS390 AND DYS393: Optimization of a PCR Pentaplex. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 106, n. (3), p.163-72, Dec 1999

HENKE, J. *et al.* Application of Y-Chromossome STR Haplotype to Forensic Genetics. **Croat Méd J**, Croácia, v. 42, n. (3), p.292-7, Jun. 2001

HOLTKEMPER, U. *et al.* Mutation Rates At Two Human Y-Chromosomal Microsatellite Loci Using Small Pool PCR Techniques. **Hum Mol Genet**, Reino Unido, v. 10, n. (6), p.629-33, Mar. 2001

HONDA, K. *et al.* Male DNA Typing From 25-Year-Old Vaginal Swabs Using Y Chromosomal STR Polymorphisms In A Retrial Request Case. **J Forensic Sci**, Estados Unidos da América, v. 44, n.(4), p.868-72, Jul. 1999

HONDA, K. *et al.* Examination of Y-STR mutations in sex chromosomal abnormality in forensic cases. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n. (2-3), p.136-40, May. 2001

HOU,Y.P. *et al.* Allele sequences of six new Y-STR loci and haplotypes in the Chinese Han Population. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n. (2-3), p.147-52, May. 2001

JOBLING, M.A. Y-chromosomal SNP haplotype diversity in forensic analysis. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n.(2-3), p.158-62, May. 2001

JUNGE, A.; MADEA, B. Population studies of the Y-chromosome specific polymorphisms DYS19, DYS389 I +II, DYS390 and DYS393 in a western German population (Bonn area). **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 101, n. (3), p.195-201, May. 1999

KARGEL, H.J.; SACKEWITZ, H. Examples for use of the STR systems in stain assessment with special reference to Y chromosome systems. **Arch Kriminol**, Alemanha, v. 204, n.(5-6), p.175-85, Nov-Dec. 1999

KAYSER, M.; SAJANTILA, A. Mutations at Y-STR loci: implications for paternity testing and forensic analysis. **Forensic Sci Int**. Suíça, v. 118, n. (2-3), p.116-21, May. 2001

KAYSER, M. *et. al.* An extensive analysis of Y-chromosomal microsatellite haplotypes in globally dispersed human populations. **Am J Hum Genet**, Estados Unidos da América, v. 68, n. (4), p.990-1018, Apr. 2001

KAYSER, M. *et. al.* Evaluation of Y-chromosomal STRs: a Multicenter Study. **Int J Legal Med**. Alemanha, v. 110, n. (3), p.125-33, 1997

KNIJFF, P. *et. al.* Chromosome Y microsatellites: population genetic and evolutionary aspects. **Int J Legal Med**, Alemanha, v. 110, n. (3), p.134-49, 1997

LESSIG, R. *et. al.* Population Genetics of Y-chromosomal Microsatellites in Baltic Males. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n. (2-3), p.153-7, May 2001

LESSIG,R,; EDELMANN, J. Population data of Y-chromosomal STRs in Lithuanian, Latvian and Estonian males. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 120, n. 3, p.223-225, July. 2001

MARTIN,S. **Human Chromosome Y**, s.d. Disponível em: <<http://www.oml.gov/hgmis/launchpad/chromY.html>> Acesso em 14 jun. 2001

MESA, N.R. *et. al.* Autosomal, mtDNA, and Y-chromosome diversity in Amerinds: pre- and post-Columbian patterns of gene flow in South America. **Am J Hum Genet**, Estados Unidos da América, v. 67, n. (5), p.1277-86, Nov. 2000

MONSALVE,M.V. *et al.* The Human Y Chromosome: Racial Variation And Evolution. **Ver Bras Genet**, Brasil, v. 3, n. (4), p.433-46, Dec.1980

MORLING, N. *et al.* Paternity Testing Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on genetic investigations in paternity cases. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 129, n. (3), p.148-157, Oct. 2002

NATA, M.; BRINKMANN, B.; ROLF, B. Y-chromosomal STR haplotypes in a population from north west Germany. **Int J Legal Med**, Alemanha, v. 112, n. (??), p.406-408, 1999

OLIVEIRA, R. Frequência Alélica dos Lócus DYS390, DYS 391 e DYS 393 em Indivíduos Brasileiros e Sua Aplicação a Identificação Humana. **Tese (Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia)**, Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP, 2001

PARSON, W. *et al.* When autosomal short tandem repeats fail: optimized primer and reaction design for Y-chromosome short tandem repeat analysis in forensic casework. **Croat Med J**, Croácia, v. 42, n. (3), p.285-7, Jun. 2001

PEREZ-LEZAUN, A. *et al.* Population genetics of Y-chromosome short tandem repeats in humans. **J Mol Evol**. Alemanha, v. 45, n. (3), p.265-70, Sep. 1997

PRINZ, M.; SANSONE, M. Y chromosome-specific short tandem repeats in forensic casework. **Croat Med J**, Croácia, v. 42, n. (3), p.288-91, Jun. 2001

PRINZ, M. *et al.* Validation and casework application of a Y chromosome specific STR multiplex. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 120, n. (3), p.177-88, Sep. 2001

QUINTANA-MURCI, L. The human Y chromosome, function, evolution and disease. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 118, n. (2-3), p.169-181, 2001

RANGEL-VILLALOBOS, H. *et al.* Y-Chromossome Haplotypes For Six Short Tandem Repeats (STRs) In A Mexican Population. **Arch Méd Res**, v. 32, n. (3), p.232-7, May-Jun. 2001

REDD, A.J.; CLIFFORD, S.L.; STONEKING, M. Multiplex DNA typing of short-tandem-repeat loci on the Y chromosome. **Biol Chem**, v. 378, n. (8), p.923-7, Aug. 1997

RICCI, U.; SANI, I.; GIOVANNUCCI UZIELLI, M.L. Y-chromosomal STR haplotype in Tuscany (central Italy). **Forensic Sci Int**. Suíça, v. 120, n. (3), p.210-2, Sep. 2001

RODRIGUEZ-DELFIN, L.A.; RUBIN-DE-CELIS, V.E.; ZAGO, M.A. Genetic Diversity In An Andean Population From Peru And Regional Migration Patterns Of Amerindians In South America: Data From Y Chromosome And Mitochondrial DNA. **Hum Hered**, Suíça, v. 51, n. (1-2), p.97-106, 2001

ROSSI,E.; ROLF,B.; SCHÜRENKAMP,M.; BRINKMANN,B. Y-ChromosomeSTR Haplotypes in an Italian Population Sample. **Int J Legal Med**, Alemanha, v. 112, n. (1), p.78-81, 1998

ROEWER, L. *et al.* A new method for the evaluation of matches in non-recombining genomes:application to Y-chromosomal short tandem repeat (STR) haplotypes in European males. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 114, n. (1), p.31-43, Oct. 2000

SALA, A. *et al.* Reference Database Of Hypervariable Genetic Markers Of Argentina: Application For Molecular Anthropology And Forensic Casework. **Electrophoresis**, Alemanha, v. 20, n. (8), p.1733-9, Jun. 1999

SCHMITT, C. *et al.* High Sensitive DNA Typing Approaches For The Analysis Of Forensic Evidence:Comparison Of Nested Variable Number Of Tandem Repeats (VNTR) amplification and a short tandem repeats (STR) polymorphism. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 66, n. (2), p.129-41, Jun. 1994

SCHNEIDER, P.M. Results Of Collaborative Study Regarding The Standardization Of The Y-Linked STR System DYS385 By The European DNA Profiling (EDNAP) Group. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 102, n. (2-3), p.159-65, Jun. 1999

SCHULTES, T.; HUMMEL, S.; HERRMANN, B. Amplification Of Y-Chromosomal STRs From Ancient Skeletal Material. **Hum Genet**, Alemanha, v. 104, n. (2), p.164-6, Feb. 1999

STERLINKO,H. *et al.* Human Y-specific STR haplotypes in a Slovenian population sample. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 120, n. (3), p.226-228, Sep. 2001

SZIBOR, R.; KAYSER, M.; ROEWER, L. Identification Of The Human Y-Chromosomal Microsatellite Locus DYS19 From Degraded DNA. **Am J Forensic Med Pathol**, Estados Unidos da América, v. 21, n. (3), p.252-4, Sep. 2000

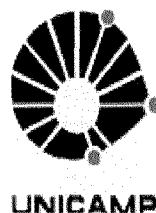
TARAZONA-SANTOS, E. *et al.* Genetic Differentiation In South Amerindians Is Related To Environmental And Cultural Diversity: Evidence From The Y chromosome. **Am J Hum Genet**, Estados Unidos da América, v. 68, n. (6), p.1485-96, Jun. 2001

TSUJI, A. *et al.* Personal identification using Y-chromosomal short tandem repeats from bodily fluids mixed with semen. **Am J Forensic Med Pathol**, Estados Unidos da América, v. 22, n. (3), p.288-91, Sep. 2001

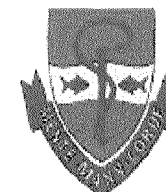
UNDERHILL, P.A. *et al.* A Pre-Columbian Y Chromosome-Specific Transition And Its Implications For Human Evolutionary History. **Proc Natl Acad Sci USA**, Estados Unidos da América, v. 93, n. (1), p.196-200, Jan. 1996

VANEK,D.; HRADIL,R.; BRUDOWLE,B. Czech population data on 10 short tandem repeat loci of SGM Plus STR system kit using DNA purified in FTATMcards. **Forensic Sci Int**, Suíça, v. 119, n. (1), p.107-108, Jun. 2001

ZEHNER, R. ; BOHRER, U. DYS19 and Amelogenin in Artificial Blood Stains With Defined Amounts Of Male And Female Cells. **Int J Legal Med**, Alemanha, v. 111, n. (6), p.340-2, 1998



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
CERTIFICADO



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Frequência alélica dos locus dys 19, dys 389 i/ii, dys 390, dys 391, dys 392, dys 393, dys 385 na população de mato grosso", sob o protocolo nº **101/2001**, da Pesquisadora **Isa Azevedo de Almeida**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Dagmar De Paula Queluz**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 12 de setembro de 2001

We certify that the research project with title "Allelic frequency in locus dys 19, dys 389 i/ii, dys 390, dys 391, dys 392, dys 393, dys 385 in individuals of mato grosso population", protocol nº **101/2001**, by Researcher **Isa Azevedo de Almeida**, responsibility by Prof. Dr. **Dagmar De Paula Queluz**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Resarch at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, September 12 2001

Pedro Luiz Rosalen
 Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP

Antonio Bento Alves de Moraes
 Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO B

**ESTADO DE MATO GROSSO
SECRETARIA DE SEGURANÇA PÚBLICA
COORDENADORIA DE MEDICINA LEGAL
COORDENADORIA GERAL DE PERÍCIAS E IDENTIFICAÇÕES**



AUTORIZAÇÃO

Autorizo a aluna do curso de pós graduação à nível de Mestrado – Doutorado em Odontologia Legal e Deontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba UNICAMP **ISA AZEVEDO DE ALMEIDA**, a coletar restos de sangue, coletados previamente para Exame Toxicológico desta Coordenadoria de Medicina Legal para fins da pesquisa intitulada estudo da frequência Alélica dos Locus DYS 390, DYS 19, DYS 391, DYS 392, DYS 393 e DYS 385.

Deve-se ressaltar que esta Autorização terá validade após a Aprovação do Comitê de Ética a qual a Aluna pertence.

Cuiabá-MT., 23 de Maio de 2001


Dr. Célio Spadácio
Coordenador de Medicina Legal

ANEXO C

nºLaudo	Nome	Sexo	Idade	Cor de pele
553/01	LRA	M	16	?
556/01	AR	M	46	Branca
558/01	JBSF	M	14	Parda
562/01	LBA	M	40	Parda
568/01	ALPMS	M	17	Branca
573/01	JOAT	M	35	Branca
729/01	ACS	M	19	Parda
733/01	JOMR	M	19	Parda
774/01	JBS	M	41	Branca
785/01	FC	M	26	Branca
805/01	JASG	M	34	Branca
854/01	IDS	M	50	Parda
728/01	JIM	M	47	Parda
767/01	BB	M	?	?
771/01	RJS	M	23	Parda
772/01	JTS	M	57	Branca
803/01	IEC	M	22	Parda
804/01	JCO	M	?	?
827/01	CC	M	49	Parda
849/01	CS	M	26	Parda
874/01	LSS	M	52	Parda
876/01	JLF	M	?	?
893/01	VFF	M	38	Parda
894/01	ALP	M	52	Parda
913/01	AH	M	22	Branca
553/01	AOJ	M	26	Parda
556/01	DMS	M	22	Parda

ANEXO D



International Society for Forensic Genetics (ISFG)

Home

What is ISFG?

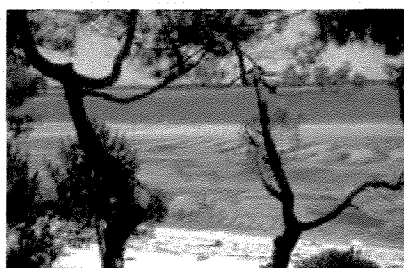
Working groups

Meetings

Statutes

Membership

Publications



20th Congress of the ISFG
Arcachon, France, September 9 - 13, 2003

Homepage area with restricted access (for ISFG members only) with news, documents, downloads, addresses and a new forensic discussion forum ...

ANEXO E

The Genome Database

An international collaboration in support of the Human Genome Project.



Hosted by The Hospital for Sick
Children, Toronto, Ontario CANADA
and available at [mirror sites](#)
[worldwide](#)

What's New (2 January, 2003):

- [Server Upgrade, 8 May](#)
- [e-PCR Tools and Database Upgraded, 20 April](#)

Database is Read-Only

Editing and BLAST are Inactive

ANEXO F

last modified Jun 5, 1998

GDB Locus name: DYS393

Genbank accession G09601.

Alias CHLC.GATA43G06.P14915.

GDB: G00-455-838, accession id GDB:455838.

Homologous locus:

GDB Locus name: DYS395

Genbank accession G10038.

Alias CHLC.GATA81D05.P18481.

GDB: G00-455-955, accession id GDB: 455955.

Consensus sequence structure: Allele DYS393-15, 131 bp.

5'..GTGGTCTTCTACTTGTGTCAATACAGATAGATAGATAGA
TAGATAGATAGATAGATA
GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATATGTATGTCTTTTCTATGAGACAT
ACCTCATT
TTTTGGACTTGAGTT..3'

ANEXO G

last modified Jun 5, 1998

GDB Locus name: DYS392

Genbank accession G09867.

Alias CHLC.ATA25F04.P16979.

GDB: G00-455-698, accession id GDB:455698.

Consensus sequence structure: Allele DYS392-16, 263 bp.

5'..TCATTAATCTAGCTTTTAAAAACAACATAATTTGATTTCAGTG
TTTGTTATTTAA
AAGCCAAGAAGGAAAACAAATTTTTTTCTTGATCACCATTATTTATTATT
ATTATTAT
TATTATTATTATTATTATTATTATTATTATTACTAAGGAATGGGATTG
GTAGGTTTAA
TGATCCCTCTGTTTTGACTTCTTTGAGATATTTCAGACTACTTCCACTTTGAC
TG TA
GGAATTT ACATTGCATCAACTGGG TC T..3'

ANEXO H

last modified Jun 5, 1998

GDB Locus name: DYS391

Genbank accession G09613.

Alias CHLC.GATA32C10.P14988.

GDB: G00-365-251, accession id GDB:365251.

Consensus sequence structure: Allele DYS391-9, 279 bp..

5'..CTATTCATTCAATCATACACCCATATCTGTCTGTCTG<

em>TCTATCTATCTATCTATCT

ATCTATCTATCTATCTATCTGCCTATCTGCCTGCCTACCTATCCCTCTATG

GCAATTG

CTTGCAACCAGGGAGATTTTATTCCCAGGAGATATTTGGCTATGTGTGACAACA

A TT

TTTTTGGTTGTCACAAATGGGATGAATGTTACTGGCATCTGGTGGGTGGAGCCC

A GA

GATGCTGCTCAACACCCTACAGTGCACAAGAC AGACC

CACCACAAAGAATC...3'

ANEXO I

last modified Jun 5, 1998

GDB Locus name: DYS390

Genbank accession G09611

Alias CHLC.GATA31E10.P14963.

GDB: G00-365-248, accession id GDB:365248

Consensus sequence structure: Allele DYS390-27 (8-14-1-4), 227 bp.

5'..TATATTTTACACATTTTTGGGCCCTGCATTTTGGTACCCCAT
ATATATTCTATC
TATCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTATCTATCTATCTAT
CTATCTATCTAT
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTATCTATCTATCTATCAT
CTATCTATCTTT
CCTTGTTTCTGAGTATACA C ATT GCAATGTGTTTCATTTTACTGTCA.3'

ANEXO J

*last modified Jun 5, 1998***GDB Locus name: DYS389**

Genbank accession G09600 & X97312.

CHLC.GATA30F10.P14912

GDB: G00-365-241, accession id GDB:365241

Consensus sequence structure: Allele DYS389-31, 375 bp.

5'..CCAACTCTCATCTGTATTATCTATGTGTGTGTCTGTCTGTCTG
TCTGTCTGTCTAT
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCATTATACC
TACTTCTGTA
TCCAACTCTCATCTGTATTATCTATGTATCTGTCTGTCTGTCTAT
CTATCTATCTAT
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCCCTCCCTCTATCAATCTATCTATTTAT
C TA
GCAGTCCATCATCTATCTATGACATTCTTCTGCTACTCAGGGATAATTGTGTTCC
T CA
AGTAACACTTGGCAATGTCTGGAAACAATTTTGGCAGTTGCACTGGGATGGGT
GT TC
TCGCATCTGGTGGGTGGAGATAAGA..3'

ANEXO L

*last modified Jun 5, 1998***GDB Locus name: DYS19**

Alias Y27H39

Genbank accession X77751

Homologous locus:

GDB Locus name: DYS394

Genbank accession G10053


Alias CHLC.GATA73F02.P18616

GDB: G00-455-927, accession id GDB:455927

Consensus sequence structure: Allele DYS19-13, 186 bp.

5'..CTACTGAGTTTCTGTTATAGTGTTTTTTAATATATATATAGTA
TTATATATATAG
TGTTATATATATATATAGTGTTTTAGATAGATAGATAGGTAGATAGATA
GATAGATAGATA
GATAGATAGATAGATAGATATAGTGACACTCTCCTTAACCCAGATGGACTC
CTTGTCCT
TCACTACATGCCAT..3'

ANEXO M



Y About

Quality control / validation

Haplotype contribution

Primers & Protocols

Population Analysis

Contact

Acknowledgment

III. Y-User Workshop

Start Search

Y-STR Haplotype Reference Database for U.S. Populations

generated by Manfred Kayser and Mark Stoneking
 Max Plank Institute for Evolutionary Anthropology Leipzig, Germany
 in cooperation with Mechthild Prinz (New York City) and Lutz Roewer (Berlin)
 Y STR Database© websites created by Sascha Willuweit (Berlin)

This database has been accessed **12346** times since 18/02/2001. Last haplotype entry **6/26/2002**

Current state of the database:	30 regional U.S. population samples: 10 African-American, 11 European-American, 9 Hispanic
	1705 9-locus (minimal) haplotypes: 599 African-American, 628 European-American, 478 Hispanic

The relevant publication for citing the **Y-STR Haplotype Reference Database for U.S. Populations** is:

Kayser M, Brauer S, Willuweit S, Schädlich H, Batzer MA, Zawacki J, Prinz M, Roewer L, and Stoneking M (2002) Online Y-chromosomal short tandem repeat haplotype reference database (YHRD) for U.S. populations. Journal of Forensic Sciences(2002), 47(3): 513-519


The ability to identify male-specific DNA renders Y-chromosomal STR markers an invaluable addition to the standard panel of autosomal loci used in forensic DNA analysis.

ANEXO N


GEP-ISFH

MENÚ:

- [INF. GENERAL](#)
- [ESP. POR. IBE](#)
- [G. DE TRABAJO](#)
- [C. CALIDAD](#)
- [REUNIÓN ANUAL](#)
- [PUBLICACIONES](#)
- [LINKS](#)









1995-
GEP-
ISFH



GEP-ISFH

GRUPO ESPAÑOL Y PORTUGUÉS DE LA ISFH

	Información general Estatutos	Agradecimientos
	Laboratorios de la GEP-ISFH: España Portugal Iberoamérica	
	Control de Calidad Anual de ADN	 <p>PRÓXIMA REUNIÓN DEL GEP-</p>
	Reunión anual del GEP-ISFH	
	Grupos de trabajo	

